

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

BEST AVAILABLE COPY

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT
D'UN CHANGEMENT(règle 92bis.1 et
instruction administrative 422 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

NIEDERST, Claire
Aventis Pharma
20, avenue Raymond Aron
F-92165 Antony Cedex
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 14 février 2000 (14.02.00)	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire ST98009	NOTIFICATION IMPORTANTE
Demande internationale no PCT/FR99/00740	Date du dépôt international (jour/mois/année) 30 mars 1999 (30.03.99)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:

☐ le déposant ☐ l'inventeur ☒ le mandataire ☐ le représentant commun

Nom et adresse

NIEDERST, Claire
Rhône-Poulenc Rorer S.A.
20, avenue Raymond Aron
F-92165 Antony Cedex
FRANCE

Nationalité (nom de l'Etat)

Domicile (nom de l'Etat)

no de téléphone

01 55 71 73 26

no de télécopieur

01 55 71 72 91

no de téléimprimeur

2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:

☐ la personne ☐ le nom ☒ l'adresse ☐ la nationalité ☐ le domicile

Nom et adresse

NIEDERST, Claire
Aventis Pharma
20, avenue Raymond Aron
F-92165 Antony Cedex
FRANCE

Nationalité (nom de l'Etat)

Domicile (nom de l'Etat)

no de téléphone

01 55 71 73 26

no de télécopieur

01 55 71 72 91

no de téléimprimeur

3. Observations complémentaires, le cas échéant:

4. Une copie de cette notification a été envoyée:

☒ à l'office récepteur ☐ aux offices désignés concernés
☐ à l'administration chargée de la recherche internationale ☒ aux offices élus concernés
☒ à l'administration chargée de l'examen préliminaire international ☐ autre destinataire:

8

7

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé:

Eugénia Santos

no de téléphone (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT
D'UN CHANGEMENT

(règle 92bis.1 et
instruction administrative 422 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

NIEDERST, Claire
Aventis Pharma
20, avenue Raymond Aron
F-92165 Antony Cedex
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 14 février 2000 (14.02.00)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire ST98009	
Demande internationale no PCT/FR99/00740	Date du dépôt international (jour/mois/année) 30 mars 1999 (30.03.99)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:	
<input checked="" type="checkbox"/> le déposant	<input type="checkbox"/> l'inventeur <input type="checkbox"/> le mandataire <input type="checkbox"/> le représentant commun
Nom et adresse RHONE-POULENC RORER S.A. 20, avenue Raymond Aron F-92160 Antony FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR
	Domicile (nom de l'Etat) FR
	no de téléphone
	no de télécopieur
2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:	
<input type="checkbox"/> la personne	<input checked="" type="checkbox"/> le nom <input type="checkbox"/> l'adresse <input type="checkbox"/> la nationalité <input type="checkbox"/> le domicile
Nom et adresse AVENTIS PHARMA 20, avenue Raymond Aron F-92160 Antony FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR
	Domicile (nom de l'Etat) FR
	no de téléphone
	no de télécopieur
3. Observations complémentaires, le cas échéant:	
4. Une copie de cette notification a été envoyée:	
<input checked="" type="checkbox"/> à l'office récepteur	<input type="checkbox"/> aux offices désignés concernés
<input type="checkbox"/> à l'administration chargée de la recherche internationale	<input checked="" type="checkbox"/> aux offices élus concernés
<input checked="" type="checkbox"/> à l'administration chargée de l'examen préliminaire international	<input type="checkbox"/> autre destinataire:

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé: Eugénia Santos
no de télécopieur (41-22) 740.14.35	no de téléphone (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT
D'UN CHANGEMENT(règle 92bis.1 et
instruction administrative 422 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

NIEDERST, Claire
Aventis Pharma
20, avenue Raymond Aron
F-92165 Antony Cedex
FRANCE

BEST AVAILABLE COPY

Date d'expédition (jour/mois/année) 11 août 2000 (11.08.00)	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire ST98009	NOTIFICATION IMPORTANTE
Demande internationale no PCT/FR99/00740	Date du dépôt international (jour/mois/année) 30 mars 1999 (30.03.99)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:

☒ le déposant ☐ l'inventeur ☐ le mandataire ☐ le représentant commun

Nom et adresse AVENTIS PHARMA 20, avenue Raymond Aron F-92160 Antony FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	no de téléphone	
	no de télécopieur	
	no de téléimprimeur	

2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:

☐ la personne ☒ le nom ☐ l'adresse ☐ la nationalité ☐ le domicile

Nom et adresse AVENTIS PHARMA S.A. 20, avenue Raymond Aron F-92160 Antony FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	no de téléphone	
	no de télécopieur	
	no de téléimprimeur	

3. Observations complémentaires, le cas échéant:

4. Une copie de cette notification a été envoyée:

<input checked="" type="checkbox"/> à l'office récepteur	<input type="checkbox"/> aux offices désignés concernés
<input type="checkbox"/> à l'administration chargée de la recherche internationale	<input checked="" type="checkbox"/> aux offices élus concernés
<input checked="" type="checkbox"/> à l'administration chargée de l'examen préliminaire international	<input type="checkbox"/> autre destinataire:

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé: R. Chrem no de téléphone (41-22) 338.83.38
---	--

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITEMENT DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Assistant Commissioner for Patents
 United States Patent and Trademark
 Office
 Box PCT
 Washington, D.C.20231
 ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 18 novembre 1999 (18.11.99)	
Demande internationale no PCT/FR99/00740	Référence du dossier du déposant ou du mandataire ST98009
Date du dépôt international (jour/mois/année) 30 mars 1999 (30.03.99)	Date de priorité (jour/mois/année) 02 avril 1998 (02.04.98)
Déposant BYK, Gerardo etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

19 octobre 1999 (19.10.99)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé Diana Nissen
no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	no de téléphone: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire ST98009	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après	
Demande internationale n° PCT/FR 99/ 00740	Date du dépôt international (jour/mois/année) 30/03/1999	(Date de priorité la plus ancienne) (jour/mois/année) 02/04/1998
Déposant RHONE-POULENC RORER S.A. et al.		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 4X feuilles.

☐ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.

☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :

☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.

☐ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☒ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le titre,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.

☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'abrégé,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la Figure n°

☐ suggérée par le déposant.

☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.

☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☒ Aucune des figures n'est à publier.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☒ Les revendications n^{os} 28 se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
Remarque: Bien que la revendication 28 concerne une méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit/à la composition.
2. ☐ Les revendications n^{os} se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n^{os} sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n^{os}
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n^{os}

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

FR 99/00740

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C07D233/48 C07D239/14 C12N15/87 A61K31/47 C07J41/00
C07K5/06

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07D C12N A61K C07K C07J

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO 97 18185 A (RHONE-POULENC RORER S.A.) 22 mai 1997 cité dans la demande voir revendications ---	1-28
Y	WO 97 31935 A (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 4 septembre 1997 voir revendications ---	1-28
A	WO 96 17823 A (RHONE POULENC RORER SA) 13 juin 1996 voir revendications ---	1-28
A	WO 95 18863 A (RHONE POULENC RORER SA) 13 juillet 1995 voir revendications ---	1-28
	--- -/--	



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

20 mai 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

31/05/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Henry, J

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 0 394 111 A (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 24 octobre 1990 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-28
A	WO 93 05162 A (THE UNIVERSITY OF TENNESSEE RESEARCH CORPORATION) 18 mars 1993 voir revendications -----	1-28

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

FR 99/00740

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9718185	A	22-05-1997	FR 2741069 A	16-05-1997
			AU 7576896 A	05-06-1997
			CA 2235721 A	22-05-1997
			CZ 9801473 A	12-08-1998
			EP 0861228 A	02-09-1998
			NO 981944 A	29-04-1998
WO 9731935	A	04-09-1997	FR 2745569 A	05-09-1997
			FR 2751972 A	06-02-1998
			AU 1930497 A	16-09-1997
			CZ 9802772 A	16-12-1998
			EP 0888379 A	07-01-1999
			NO 983691 A	12-08-1998
WO 9617823	A	13-06-1996	FR 2727679 A	07-06-1996
			AU 4307296 A	26-06-1996
			BR 9510080 A	30-12-1997
			CA 2208184 A	13-06-1996
			CZ 9701711 A	18-03-1998
			EP 0796240 A	24-09-1997
			FI 972366 A	04-06-1997
			HU 77171 A	02-03-1998
			JP 10509958 T	29-09-1998
			NO 972566 A	05-06-1997
			SK 70197 A	05-11-1997
			ZA 9510326 A	11-06-1996
WO 9518863	A	13-07-1995	FR 2714830 A	13-07-1995
			AU 1458395 A	01-08-1995
			CA 2180872 A	13-07-1995
			EP 0738328 A	23-10-1996
			FI 962799 A	09-07-1996
			JP 9508100 T	19-08-1997
			NO 962791 A	02-07-1996
			US 5846947 A	08-12-1998
			ZA 9500137 A	09-09-1995
EP 0394111	A	24-10-1990	FR 2645866 A	19-10-1990
			AT 154035 T	15-06-1997
			CA 2014518 A	17-10-1990
			DE 69030839 D	10-07-1997
			DE 69030839 T	20-11-1997
			DK 394111 T	08-09-1997
			ES 2104593 T	16-10-1997
			FR 2646161 A	26-10-1990
			GR 3023691 T	30-09-1997
			IL 94077 A	29-12-1994
			JP 2292246 A	03-12-1990
			JP 2716565 B	18-02-1998
			US 5476962 A	19-12-1995
			US 5616745 A	01-04-1997
			US 5171678 A	15-12-1992
WO 9305162	A	18-03-1993	US 5283185 A	01-02-1994
			AU 665029 B	14-12-1995
			AU 2656592 A	05-04-1993
			CA 2116676 A	18-03-1993
			EP 0663013 A	19-07-1995

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

FR 99/00740

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9305162 A		JP 7500963 T SG 50630 A	02-02-1995 20-07-1998
<hr/>			

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Translation

09647678
0500
1500BEFORE
AVAIL ADI

Applicant's or agent's file reference ST98009	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR99/00740	International filing date (day/month/year) 30 March 1999 (30.03.99)	Priority date (day/month/year) 02 April 1998 (02.04.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07D 233/48		
Applicant AVENTIS PHARMA S.A.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 2 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 19 October 1999 (19.10.99)	Date of completion of this report 30 June 2000 (30.06.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**Legal Staff
International Division**

08 MAY 2001

RECEIVED

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/00740

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.):

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-25,27-53, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages 26, filed with the letter of 28 January 2000 (28.01.2000),
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. 1-28, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. _____, filed with the letter of _____,
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 2/10-10/10, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig 1/10, filed with the letter of 28 January 2000 (28.01.2000),
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/00740

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 26-28

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 26-28 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (specify):

See separate sheet.

☐ the description, claims or drawings (indicate particular elements below) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (specify):

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

☐ no international search report has been established for said claims Nos.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 99/00740

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III

SECTION III

The PCT member States PCT do not have a single criterion for determining whether Claims 26-28 are industrially applicable. Patentability may also depend on the formulation of the claims. The European Patent Office, for example, does not recognize as industrially applicable the subject matter of claims to the use of a compound in a medical treatment. It does, however, allow claims to the first use of a known compound in a medical treatment or to the use of such a compound in the manufacture of a drug for a new medical treatment.

This Authority considers that the subject matter of Claims 26-28 is covered by the provisions of PCT Rule 67.1(iv). No opinion will therefore be given with regard to the industrial applicability of the claims (PCT Article 34(4)(a)(i)).

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 99/00740

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-28	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	9	YES
	Claims	1-8, 9-28	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-25	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Reference is made to the following documents:

D1: WO 97 18185 A (RHONE-POULENC RORER S.A.) 22 May 1997 cited in the application

D2: WO 97 31935 A (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 4 September 1997

D3: WO 96 17823 A (RHONE POULENC RORER SA) 13 June 1996

D4: WO 95 18863 A (RHONE POULENC RORER SA) 13 July 1995

D5: EP-A-0394 111 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 24 October 1990 cited in the application

D6: WO 93 05162 A (THE UNIVERSITY OF TENNESSEE RESEARCH CORPORATION) 18 March 1993

1). The object of these claims is novel in relation to documents D1-D6 by virtue of the compounds claimed being of CA group with a cyclic structure (cycloamidine) - PCT Article 33 (2).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: V

BEST AVAILABLE COPY

2). The technical problem posed is to make available useful novel compounds for in vitro or in vivo nucleic acid transfection in cells.

The closest prior art is found in D1, in which lypopolyamines are disclosed as transfection agents. The claimed compound (1) differs from lipid B, structurally the closest compound, only by the presence of an imino grouping ($-C=NH-$) joining the two amino groupings.

In view of this structural difference between the two compounds claimed and those in prior art disclosed in D1, it is considered that the problem has been solved in a way that is non-obvious, as a person skilled in the art could not have anticipated that the claimed compounds would retain the properties of transfection of nucleic acids into cells, in vitro and in vivo.

Indeed even slight changes in the structure of cationic lipids can have a significant impact on their effectiveness as transferring agents. Moreover the relationship between the structure and the activity of this type of compound has not been established, making the effect of even a minor structural modification unpredictable. It is not, therefore, possible to predict whether the penetration of the nucleic acids into the cell nucleus and their expression would be affected or not, given that there are many biological barriers to be overcome between injection and gene expression.

The claimed compounds which have or which are capable of

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 99/00740

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: V

effectively having these transfection properties may therefore be recognised as having inventive step. In view of the properties shown in examples 9 to 12 of the description, inventive step may therefore be recognised in respect of compounds (1), (5) and (6) and for their obvious equivalents.

However the scope of Claim 1 seems to be much wider than generalisation from the typical examples given in the description allows, **taking into account the specific character of the technical problem to be solved.**

As mentioned earlier, even a minor structural modification to a molecule makes its uncertain that it will be able to transfect.

It is recalled that only those derivatives which are solutions to the technical problem underlying the application can be recognised as an inventive step, in other words that the effect on the basis of which inventive step is recognised must extend to the entirety of the area claimed - see T932/92, OJ EPO 6/1996, page 309).

In this case. In view of the breadth of Claim 1, it is not credible that virtually all the compounds covered by Claim 1 should possess such transfection properties, as the claim covers compounds which cannot be considered obvious equivalents of the examples given in the description.

It is not, therefore, possible to recognise the entirety of the object of Claims 1 to 8 and 9-28 as making an inventive step (PCT Article 33(3)).

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USP)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 99/00740

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The term "steroid derivative" used in Claim 1 is vague and ambiguous, and the significance of the technical feature to which it refers remains uncertain. The object of said claim is therefore not clearly defined (PCT Article 6).

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)



Référence du dossier du déposant ou du mandataire ST98009	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR99/00740	Date du dépôt international (jour/mois/année) 30/03/1999	Date de priorité (jour/mois/année) 02/04/1998
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C07D233/48		
Déposant AVENTIS PHARMA et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 6 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
 - ☒ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent 2 feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☒ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 19/10/1999	Date d'achèvement du présent rapport 30.06.00
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Schmid, J-C N° de téléphone +49 89 2399 8347 

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

BEST AVAILABLE COPY
Demande internationale n° PCT/FR99/00740

I. Bas du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.) :

Description, pages:

1-25,27-53	version initiale		
26	reçue(s) le	01/02/2000	avec la lettre du 28/01/2000

Revendications, N°:

1-28	version initiale
------	------------------

Dessins, feuilles:

2/10-10/10	version initiale		
1/10	reçue(s) le	01/02/2000	avec la lettre du 28/01/2000

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4. Observations complémentaires, le cas échéant :

III. Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industriel

La question de savoir si l'objet de l'invention revendiquée semble être nouveau, impliquer une activité inventive (ne pas être évident) ou être susceptible d'application industriel n'a pas été examiné pour c qui concern :

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/F/99/00740

BEST AVAILABLE COPY

- ☐ l'ensemble de la demande internationale.
- ☒ les revendications n°s 26-28.

parce que :

- ☒ la demande internationale, ou les revendications n°s 26-28 en question, se rapportent à l'objet suivant, à l'égard duquel l'administration chargée de l'examen préliminaire international n'est pas tenue d'effectuer un examen préliminaire international (*préciser*) :

voir feuille séparée

- ☐ la description, les revendications ou les dessins (*en indiquer les éléments ci-dessous*), ou les revendications n°s en question ne sont pas clairs, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable (*préciser*) :
- ☐ les revendications, ou les revendications n°s en question, ne se fondent pas de façon adéquate sur la description, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable.
- ☐ il n'a pas été établi de rapport de recherche internationale pour les revendications n°s en question.

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-28
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications 9
	Non : Revendications 1-8, 9-28
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-25
	Non : Revendications

2. Citations et explications

voir feuille séparée

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :

voir feuille séparée

THIS PAGE BLANK (USPTO)

BEST AVAILABLE COPY

SECTION III

Il n'existe pas de critère unifié dans les Etats parties au PCT pour déterminer si les revendications 26-28 sont susceptibles d'application industrielle. La brevetabilité peut aussi dépendre de la manière dont les revendications ont été formulées. Ainsi, l'Office européen des brevets ne considère pas comme susceptible d'application industrielle l'objet de revendications d'utilisation d'un composé à des fins médicales. Par contre, peuvent être acceptées des revendications relatives à un composé connu, pour une première utilisation à des fins médicales ainsi que des revendications relatives à l'utilisation d'un tel composé dans la fabrication d'un médicament en vue d'un nouveau traitement médical.

La présente Administration considère que l'objet des revendications 26-28 est visé par les dispositions de la règle 67.1 (iv) PCT. C'est pourquoi il ne sera pas émis d'opinion quant à la question de savoir si l'objet de ces revendications est susceptible d'application industrielle (Article 34(4) a) i) PCT).

SECTION V

Il est fait référence aux documents suivants:

- D1: WO 97 18185 A (RHONE-POULENC RORER S.A.) 22 mai 1997 cité dans la demande
- D2: WO 97 31935 A (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 4 septembre 1997
- D3: WO 96 17823 A (RHONE POULENC RORER SA) 13 juin 1996
- D4: WO 95 18863 A (RHONE POULENC RORER SA) 13 juillet 1995
- D5: EP-A-0 394 111 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 24 octobre 1990 cité dans la demande
- D6: WO 93 05162 A (THE UNIVERSITY OF TENNESSEE RESEARCH CORPORATION) 18 mars 1993

- 1). L'objet des présentes revendications est nouveau par rapport aux documents D1-D6 en raison du groupement CA des composés revendiqués qui possède une structure cyclique (cycloamidine) -Article 33(2) PCT.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- 2). Le problème technique à résoudre est vu en la mise à disposition de nouveaux composés utiles pour la transfection d'acides nucléiques in vitro ou in vivo dans des cellules.

L'art antérieur le plus proche est vu en D1 qui divulgue des lipopolyamines comme agents de transfection.

Le composé (1) revendiqué se différencie du lipide B, qui peut être considéré comme étant le composé structurellement le plus proche, que par la présence d'un groupement imino ($-C(=NH)-$) joignant deux groupements amino entre eux.

Au vu de cette différence structurale entre les composés revendiqués et ceux de l'art antérieur divulgués dans D1, il est considéré que le problème a été résolu de façon non évidente car l'homme de métier ne pouvait s'attendre à la rétention des propriétés de transfection d'acides nucléiques in vitro ou in vivo dans des cellules pour les composés revendiqués.

En effet, des changements même légers dans la structure des lipides cationiques peuvent influencer de façon importante leur efficacité en tant qu'agent de transfert. En outre, il n'existe pas de relation entre la structure et l'activité de ce type de composé n'est pas établi rendant imprévisible l'impact d'une modification même mineure de structure. Il n'est donc pas possible de prévoir si la pénétration dans le noyau des cellules des acides nucléiques et leur expression serait ou non atteint, du fait de l'existence de nombreuses barrières biologiques entre l'injection et l'expression génétique qui doivent être surmontées.

Une activité inventive peut donc être reconnue aux composés revendiqués qui possèdent ou qui sont susceptibles de posséder effectivement ces propriétés pour la transfection.

Au vu des propriétés montrées dans les exemples 9 à 12 de la description, une activité inventive peut donc être reconnue pour les composés (1), (5) et (6) et pour leur équivalents évidents.

La portée de la revendication 1 semble cependant être beaucoup plus large que ne le permet une généralisation à partir des exemples représentatifs donnés dans la description **en tenant compte de la spécificité du problème technique à résoudre.**

Comme mentionné plus haut, une modification structurale même mineure dans

THIS PAGE BLANK (USPTO)

une molécule rend incertain son pouvoir de tranfection.

Il est rappelé qu'une activité inventive ne peut être reconnue qu'aux dérivés qui sont solutions au problème technique sous-jacent à la demande, c'est à dire que l'effet sur lequel repose la reconnaissance de l'activité inventive doit pouvoir s'exprimer sur l'ensemble du domaine revendiqué -voir T932/92, OEB JO 6/1996, page 309).

Dans le cas présent, en raison de la largeur de la revendication 1, il n'est pas crédible que pratiquement tous les composés englobés par la revendication 1 aient ces propriétés de transfection car la revendication englobe des composés qui ne peuvent pas être considérés comme des équivalents évidents des exemples donnés dans la description.

Par conséquent, il n'est pas possible de reconnaître une activité inventive pour l'ensemble de l'objet des revendications 1 à 8 et 9-28 (Article 33(3) PCT).

SECTION VIII

Le terme "dérivé de stéroïde" utilisé dans la revendication 1 est vague et équivoque, et laisse un doute quant à la signification de la caractéristique technique à laquelle il se réfère. L'objet de ladite revendication n'est donc pas clairement défini (Article 6 PCT).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

BEST AVAILABLE COPY

pour préparer les composés de formule générale (I). Bien entendu, il est à la portée de l'homme du métier de s'inspirer de ces protocoles et/ou produits intermédiaires pour mettre au point des procédures analogues en vue de conduire à d'autres composés de formule générale (I) selon l'invention.

5 FIGURES

Figure 1 : Structure des vecteurs synthétiques dénommé lipide A, lipide B et lipide C dans la présente invention et décrits dans la demande de brevet WO 97/18185 incorporée à la présente par référence.

Figure 2 : Représentation schématique du plasmide pXL2774.

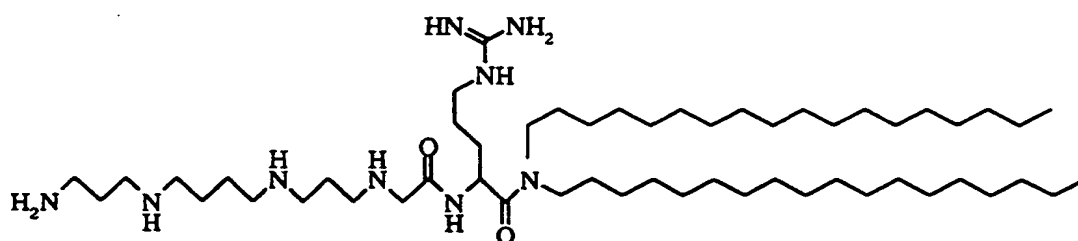
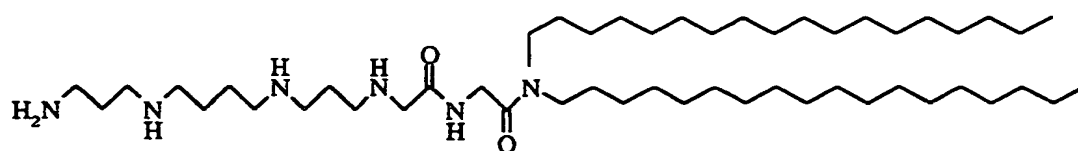
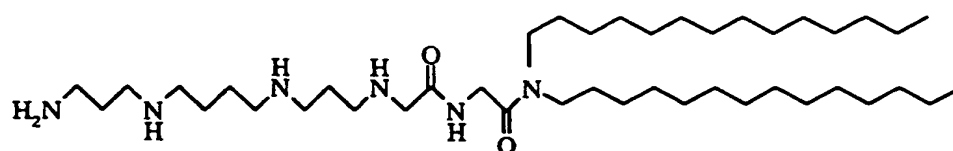
- 10 Figures 3 : Diagramme de phase des complexes nucléolipidiques composé (1)/ADN. La liaison du composé (1) à l'ADN a été déterminée en suivant la diminution de la fluorescence (en %, 100% étant la fluorescence de l'ADN nu) du bromure d'éthidium (EtBr) (symbole ●, ligne pleine), comme décrit selon l'axe y situé à droite. La taille des particules de complexes (en nm) est indiquée sur l'axe y situé à gauche. L'axe x
- 15 représente le rapport de charge agents de transfert/ADN. La taille des complexes nucléolipidiques sans co-lipide est représenté par le symbole ■ en ligne pleine. La taille des complexes nucléolipidiques contenant 25% de cholestérol est représenté par le symbole □ en ligne discontinue. La taille des complexes nucléolipidiques contenant 40% de DOPE est représenté par le symbole ◆ en ligne discontinue. La
- 20 méthode ne permet pas de déterminer la taille des particules au delà de 3 µm.

- Figure 4 : Activité de transfert de gène *in vitro* dans des cellules HeLa des complexes nucléolipidiques contenant le composé (1) selon la présente invention sans co-lipide (barre du milieu en gris foncé), avec 25% de cholestérol (barre de gauche en gris moyen), et avec 40% molaire de DOPE (barre de droite en gris clair),
- 25 comparativement à l'ADN nu. Seuls les complexes nucléolipidiques dans lesquels l'ADN est complètement saturé en composé selon l'invention et dont la taille est comprise entre 100 nm et 300 nm ont été utilisés.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

No 01.02.00

1/10

FIG. 1/10**lipide A****lipide B****lipide C**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C07D 233/48, 239/14, C12N 15/87, A61K 31/47, C07J 41/00, C07K 5/06		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/51581
			(43) Date de publication internationale: 14 octobre 1999 (14.10.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/00740 (22) Date de dépôt international: 30 mars 1999 (30.03.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/04121 2 avril 1998 (02.04.98) FR 60/085,845 18 mai 1998 (18.05.98) US (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond Aron, F-92160 Antony (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BYK, Gerardo [IL/IL]; Saadia Gaon 3, 55513 Qyriat Ono (IL). FREDERIC, Marc [FR/FR]; 32, rue Denis Papin, F-91220 Brétigny sur Orge (FR). HOFLAND, Hans [NL/US]; 126 Albacore Lane, Foster City, CA 94404 (US). SCHERMANN, Daniel [FR/FR]; 10, rue Erard, F-75012 Paris (FR). (74) Mandataire: NIEDERST, Claire; Rhône-Poulenc Rorer S.A., 20, avenue Raymond Aron, F-92165 Antony Cedex (FR).		(81) Etats désignés: AE, AL, AT, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GD, GE, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée Avec rapport de recherche internationale.	
(54) Title: NOVEL NUCLEIC ACID TRANSFER AGENTS, COMPOSITIONS CONTAINING SAME AND USES			
(54) Titre: NOUVEAUX AGENTS DE TRANSFERT D'ACIDES NUCLEIQUES, COMPOSITIONS LES CONTENANT ET LEURS APPLICATIONS			
(57) Abstract			
<p>The invention concerns novel compounds useful as agents for transferring nucleic acids into cells. Said novel compounds are more particularly related to the lipopolyamine family, and comprise at least a cyclic amidine function. They are useful for transfecting nucleic acids of interest into different cell types, <i>in vitro</i> as well as <i>in vivo</i> or <i>ex vivo</i>.</p>			
(57) Abrégé			
<p>La présente invention concerne de nouveaux composés utiles comme agents de transfert d'acides nucléiques dans les cellules. Ces nouveaux composés sont plus particulièrement apparentés à la famille des lipopolyamines, et comportent au moins une fonction amidine cyclique. Ils sont utiles pour la transfection des acides nucléiques d'intérêt dans différents types cellulaires, aussi bien <i>in vitro</i> que <i>in vivo</i> ou <i>ex vivo</i>.</p>			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

BEST AVAILABLE COPY

NOUVEAUX AGENTS DE TRANSFERT D'ACIDES NUCLÉIQUES,
COMPOSITIONS LES CONTENANT ET LEURS APPLICATIONS

La présente invention concerne de nouveaux composés utiles comme agents de transfert d'acides nucléiques dans les cellules. Ces nouveaux composés sont plus particulièrement apparentés à la famille des lipopolyamines, et comportent au moins
5 une fonction amidine cyclique. Ils sont utiles pour la transfection des acides nucléiques dans différents types cellulaires, aussi bien *in vitro* que *ex vivo* ou *in vivo*.

Avec le développement des biotechnologies, la possibilité de transférer efficacement des acides nucléiques dans les cellules est devenue une nécessité. Il peut
10 s'agir du transfert d'acides nucléiques dans des cellules *in vitro*, par exemple pour la production de protéines recombinantes, ou au laboratoire, pour l'étude de la régulation de l'expression de gènes, le clonage de gènes, ou toute autre manipulation impliquant l'ADN. Il peut également s'agir du transfert d'acides nucléiques dans des cellules *in vivo*, par exemple pour la création d'animaux transgéniques, la réalisation de vaccins,
15 des études de marquage ou également des approches thérapeutiques. Il peut encore s'agir du transfert d'acides nucléiques dans des cellules *ex vivo*, dans des approches de greffes de moelle osseuse, d'immunothérapie ou d'autres méthodes impliquant le transfert de gènes dans des cellules prélevées d'un organisme, en vue de leur réadministration ultérieure.

20 Différents types de vecteurs synthétiques ont été développés pour améliorer le transfert des acides nucléiques dans les cellules. Parmi ces vecteurs, les lipides cationiques possèdent des propriétés intéressantes. Ces vecteurs sont constitués d'une partie polaire, cationique, interagissant avec les acides nucléiques, et d'une partie lipidique, hydrophobe, favorisant la pénétration cellulaire. Des exemples particuliers
25 de lipides cationiques sont notamment les lipides monocationiques (DOTMA : Lipofectin®), certains détergents cationiques (DDAB), les lipopolyamines et en particulier la dioctadécylamidoglycyl spermine (DOGS) ou la 5-carboxyspermylamide de la palmitoylphosphatidylethanolamine (DPPES), dont la préparation a été décrite par exemple dans la demande de brevet EP 394 111. Une autre famille de

lipopolyamines est représentée par les composés tels que décrits dans la demande de brevet WO 97/18185 incorporée à la présente par référence, et sont illustrés à la figure 1.

5 Mais jusqu'à présent, les injections dans les tissus, et notamment les muscles, étaient souvent faites avec de l'ADN non-formulé afin de faciliter son entrée dans les cellules, l'association à des vecteurs synthétiques conduisant à des complexes de taille trop importante pour être incorporés dans les cellules.

C'est un des principaux problèmes que la présente invention se propose de résoudre. En effet, les composés selon l'invention possèdent l'avantage inattendu de
10 présenter un niveau de transfection *in vivo* dans le muscle au moins équivalent à celui obtenu avec l'ADN non-formulé et en tout état de cause un très bon niveau de transfection dans les autres tissus. L'association avec un composé selon l'invention protège l'ADN des dégradations par les nucléases et/ou des détériorations au cours de la lyophilisation, ce qui contribue à améliorer significativement la stabilité des
15 formulations nucléolipidiques. De plus, une telle association permet une libération contrôlée lente des acides nucléiques.

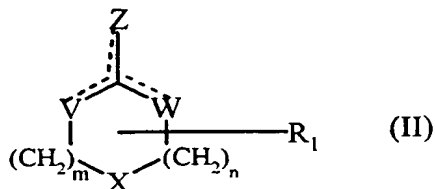
Par ailleurs, les composés selon la présente invention appartiennent à la famille des lipides cationiques et portent une région cationique originale qui confère aux dits composés des propriétés améliorées, notamment une cytotoxicité réduite par rapport
20 aux vecteurs cationiques de l'art antérieur. Cette partie cationique est en effet plus précisément représentée par une ou plusieurs polyamine particulière(s), portant une ou plusieurs fonctions amidine cycliques qui ont très probablement pour effet de « délocaliser » les charges positives, rendant le composé globalement moins cationique, avec les effets bénéfiques qui en découlent sur le plan de la toxicité.

25 Ainsi, un premier objet de l'invention concerne de nouveaux composés sous forme D, L, ou DL, de formule générale (I) :



pour laquelle :

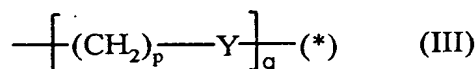
① CA représente un groupement cycloamidine et ses formes mésomères de formule générale (II) :



pour laquelle :

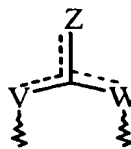
- 5 • m, et n sont des entiers indépendants l'un de l'autre compris entre 0 et 3 inclus et tels que m+n est supérieur ou égal à 1,

- R₁ représente un groupement de formule générale (III) :



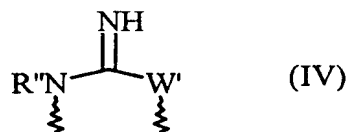
- pour laquelle p et q sont des entiers indépendants l'un de l'autre compris entre 0 et 10 inclus, Y représente un groupement carbonyle, amino, méthylamino, ou bien méthylène, Y pouvant avoir des significations différentes au sein des différents groupements [(CH₂)_p-Y], et (*) représente soit un atome d'hydrogène, soit est le lieu de liaison au groupement Rep,
- 10 étant entendu que R₁ peut être lié à n'importe quel atome de la formule générale (II), y compris Z, et qu'il y a un unique groupe R₁ dans la formule (II),
- 15

- X représente un groupement NR₂ ou bien CHR₂, R₂ étant soit un atome d'hydrogène soit la liaison au groupe R₁ tel que défini précédemment,

- Le groupement  représente :

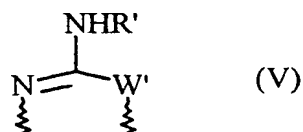
- * 1^{er} cas : un groupement de formule générale (IV) :

4



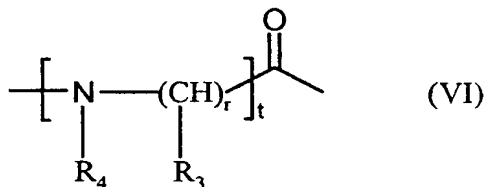
pour laquelle W' représente CHR''' ou bien NR''', et R'' et R''' représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un méthyle, ou la liaison au groupe R₁ tel que défini précédemment, ou bien

- 5 * 2^{ème} cas : un groupement de formule générale (V) :



pour laquelle W' représente CHR''' ou bien NR''', et R' et R''' représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un méthyle, ou la liaison au groupe R₁ tel que défini précédemment,

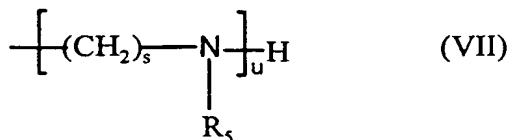
- 10 ② Rep est absent ou est un répartiteur de formule générale (VI) :



dont l'atome d'azote est rattaché aux atomes X, V, W, ou Z ou au substituant Y du groupe R₁ selon les cas, et

- t est un entier compris entre 0 et 8 inclus,
- 15
- r est un entier compris entre 0 et 10 inclus, r pouvant avoir des significations différentes au sein des différents groupements -NR₄-(CH)_r-,
 - R₃, qui peut avoir des significations différentes au sein des différents groupements NR₄-(CH)_rR₃, représente un atome d'hydrogène, un groupement méthyle, ou un groupement de formule générale (VII) :

5



BEST AVAILABLE COPY

pour laquelle u est un entier compris entre 1 et 10 inclus, s est un entier compris entre 2 et 8 inclus pouvant avoir des significations différentes au sein des différents groupements $-(\text{CH}_2)_s-\text{NR}_5$, et R_5 est un atome d'hydrogène, un groupement CA tel que

5 définis précédemment étant entendu que les groupements CA sont indépendants les uns des autres et peuvent être différents, ou bien un groupement de formule générale (VII) étant entendu que les groupements de formule générale (VII) sont indépendants les uns des autres et peuvent avoir des significations différentes,

• R_4 est défini de la même façon que R_3 ou bien représente un groupement CA tel que

10 défini précédemment étant entendu que les groupements CA sont indépendants les uns des autres et peuvent être différents, et

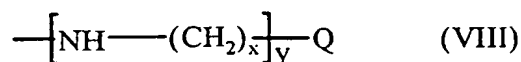
③ R est lié à la fonction carbonyle du groupement Rep de formule générale (VI), ou bien si Rep est absent R est lié directement au groupement CA, et représente :

* soit un groupement de formule NR_6R_7 pour laquelle R_6 et R_7 représentent

15 indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un radical aliphatique saturé ou non, linéaire ou ramifiée, éventuellement fluoré, contenant 1 à 22 atomes de carbone, avec l'un au moins des deux substituants R_6 ou R_7 différent de l'hydrogène et l'autre contenant entre 10 et 22 atomes de carbone,

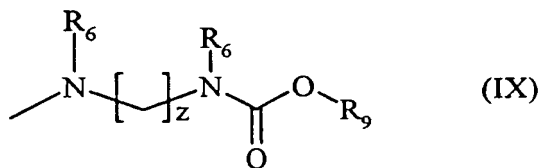
* soit un dérivé de stéroïde,

20 * soit un groupement de formule générale (VIII) :



pour laquelle x est un entier compris entre 1 et 8 inclus, y est un entier compris entre 1 et 10 inclus, et soit Q représente un groupement $\text{C}(\text{O})\text{NR}_6\text{R}_7$ pour lequel R_6 et R_7 sont

définis comme précédemment, soit Q représente un groupement $C(O)R_8$ pour lequel R_8 représente un groupement de formule (IX) :



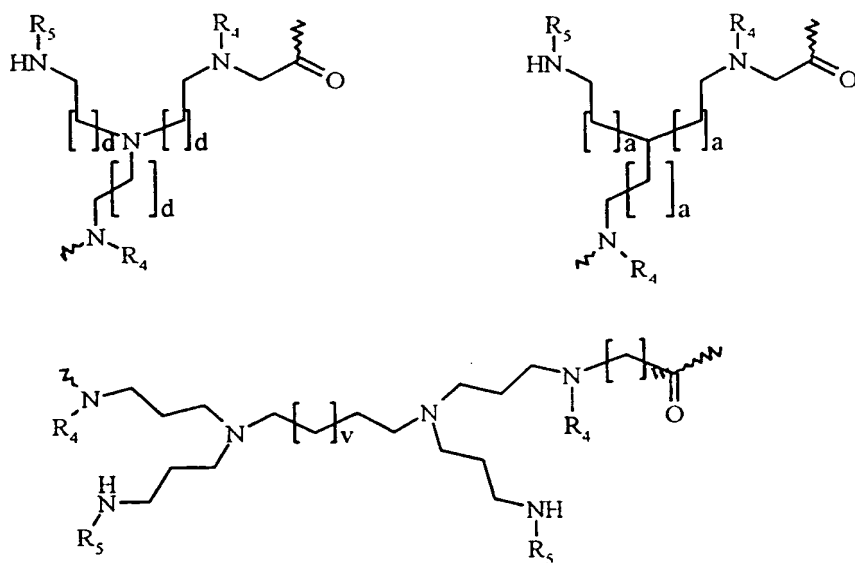
pour laquelle z est un entier compris entre 2 et 8 inclus, et R_9 est un radical aliphatique saturé ou non, éventuellement fluoré, contenant 8 à 22 atomes de carbone, ou un dérivé de stéroïde, et les deux substituants R_6 sont, indépendamment l'un de l'autre, définis comme précédemment,

ou bien R_8 représente un groupement $-O-R_9$ pour lequel R_9 est défini comme ci-dessus.

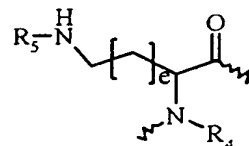
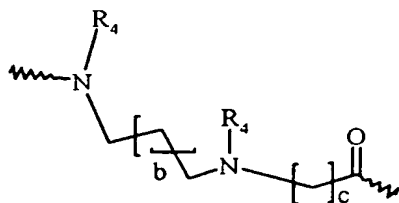
Selon une variante de l'invention, le groupement R_1 est lié soit à Z soit à V d'une part et au groupement Rep d'autre part par l'intermédiaire de Y.

Avantageusement, le groupement cycloamidine CA de formule (II) comporte 5, 6, 7 ou 8 chaînons.

Par ailleurs, dans une autre variante de l'invention, Rep est un répartiteur à 1, 2, ou 3 « bras ». On peut par exemple citer les répartiteurs suivants :



BEST AVAILABLE COPY



Selon une seconde variante de l'invention, R_3 représente un atome d'hydrogène ou un méthyle et R_4 est tel que défini précédemment, ou bien R_3 et R_4 présent dans la formule (VI) représentent des atomes d'hydrogène, ou bien R_4 est un atome d'hydrogène et R_3 est un groupement de formule (VII) dans laquelle R_5 représente un groupement CA

Préférentiellement, dans la formule (V), p et q sont choisis indépendamment l'un de l'autre parmi 2, 3 ou 4.

De manière générale, le groupement R contient au moins un segment hydrophobe. On entend au sens de l'invention par « segment hydrophobe » tout groupement de type lipidique, favorisant la pénétration cellulaire. En particulier, le groupement R contient au moins une chaîne aliphatique ou au moins un dérivé de stéroïde.

Selon une variante préférée, le groupement R représente un groupement de formule NR_6R_7 , R_6 et R_7 étant définis comme précédemment, ou bien représente un groupement de formule générale (VIII) dans laquelle Q représente un groupement $C(O)NR_6R_7$, R_6 et R_7 étant définis comme précédemment.

Préférentiellement, R_6 et/ou R_7 représentent indépendamment l'un de l'autre une chaîne aliphatique linéaire saturée ou insaturée contenant 10 à 22 atomes de carbone, de préférence en 12, 14, 16, 17, 18, ou 19 atomes de carbone. Il s'agit par exemple des groupements $(CH_2)_{11}CH_3$, $(CH_2)_{13}CH_3$, $(CH_2)_{15}CH_3$, $(CH_2)_{17}CH_3$, oléyl etc...

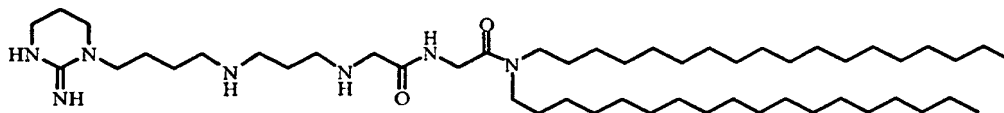
Dans un mode particulier de mise en oeuvre, les groupes R_6 et R_7 sont identiques ou différents et représentent chacun une chaîne aliphatique saturée ou non,

linéaire ou ramifiée, éventuellement fluorée, contenant 10 à 22 atomes de carbone, telle que définie au paragraphe précédent.

Lorsque R représente un dérivé de stéroïde, celui-ci est avantageusement choisi parmi le cholestérol, le cholestanol, le 3- α -5-cyclo-5- α -cholestan-6- β -ol, l'acide cholique, le cholestérylforniate, le cholestanylforniate, le 3 α ,5-cyclo-5 α -cholestan-6 β -yl formiate, la cholestérylamine, la 6-(1,5-diméthylhexyl)-3a,5a-diméthylhexadécahydrocyclopenta[a]cyclopropa[2,3]cyclopenta[1,2-f]naphta-lèn-10-ylamine, ou la cholestanylamine.

Ces nouveaux composés de formule générale (I) peuvent se présenter sous forme de sels non toxiques et pharmaceutiquement acceptables. Ces sels non toxiques comprennent les sels avec les acides minéraux (acides chlorhydrique, sulfurique, bromhydrique, phosphorique, nitrique) ou avec les acides organiques (acides acétique, propionique, succinique, maléique, hydroxymaléique, benzoïque, fumarique, méthanesulfonique ou oxalique) ou avec les bases minérales (soude, potasse, lithine, chaux) ou encore avec les bases organiques (amines tertiaires comme la triéthylamine, la pipéridine, la benzylamine).

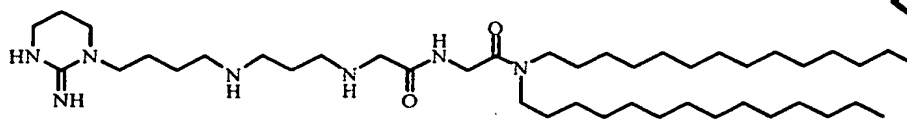
A titre d'exemple illustrant des composés préférés selon l'invention, on peut citer les composés de formules suivantes :



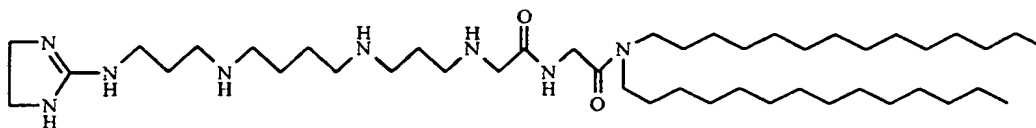
Composé (1)

N-dioctadécylcarbamoylméthyl-2-{3-[4-(2-imino-tétrahydro-pyrimidin-1-yl)-butylamino]propylamino}-acétamide

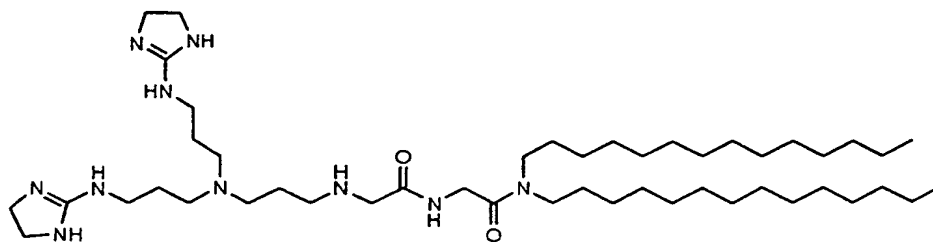
BEST AVAILABLE COPY

**composé (2)**

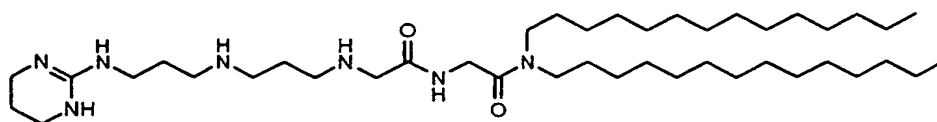
N-ditétradécylcarbamoylméthyl-2-{3-[4-(2-imino-tétrahydro-pyrimidin-1-yl)-butylamino]propylamino}-acétamide

**Composé (3)**

2-(3-{4-[3-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-ylamino)-propylamino]-butylamino}-N-ditétradécylcarbamoylméthyl)-acétamide

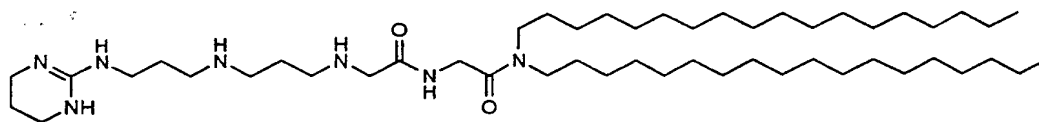
**Composé (4)**

2-(3-{bis-[3-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-ylamino)-propyl]-amino}-propylamino)-N-ditétradécylcarbamoylméthyl-acétamide.

**Composé (5)**

N-ditétradécylcarbamoylméthyl-2-{3-[3-(1,4,5,6-tétrahydropyrimidin-2-ylamino)-propylamino]propylamino}-acétamide

10

**Composé (6)**

N-dioctadécylcarbamoylméthyl-2-{3-[3-(1,4,5,6-tétrahydropyrimidin-2-ylamino)-propylamino]propylamino}-acétamide

Les composés de l'invention peuvent être préparés de différentes façons. Selon une première méthode, les composés de l'invention peuvent être obtenus par synthèse des lipopolyamines analogues (c'est-à-dire la même structure mais sans groupement cycloamidine), la cyclisation en groupements cycloamidine étant effectuée dans un second temps. Les lipopolyamines analogues peuvent être obtenues par toute méthode connue de l'homme du métier, et notamment selon les méthodes décrites dans la demande WO 97/18185 ou par des méthodes analogues. La cyclisation des têtes amidine peut par exemple être effectuée par réaction entre une et/ou plusieurs amines primaires de la lipopolyamine et des réactifs tels que l'hydrogénosulfate d'O-méthylisourée sulfate [J. Med. Chem., 1995, 38(16), pp. 3053-3061] ou le semisulfate de S-méthylisothiourée [Int. J. Pept. Prot. Res., 1992, 40, pp. 119-126]. De préférence, on opère en milieu aqueux en présence d'une base à chaud [J. Med. Chem., 1985, pp. 694-698 et J. Med. Chem., 1996, pp. 669-672]. A titre de solvant préféré, on peut citer les mélanges eau/alcool ou le diméthylformamide. A titre de base, on peut utiliser la triéthylamine, la N-éthyl-diisopropylamine, la soude, la potasse etc... La température est comprise de préférence entre 40°C et 60°C, et encore plus préférentiellement, la réaction est mise en oeuvre à 50°C.

Une autre méthode consiste à effectuer une synthèse de briques portant la fonction cycloamidine qui sont ensuite greffée(s) sur des lipides équipés de répartiteurs. Cette méthode présente l'avantage d'accéder à un nombre important de produits. Au sens de l'invention, on entend par « briques » tout segment fonctionnel de la molécule. Par exemple, le groupement cycloamidine CA tel que défini dans la formule générale (II), Rep ou encore R constituent des briques distinctes les une des autres au sens de l'invention.

BEST AVAILABLE COPY

A titre d'exemple, on peut par exemple procéder de la façon suivante :

1) Synthèse de la brique R :

a) Lorsque R représente $-NR_6R_7$, soit il est disponible commercialement, soit il peut être synthétisé selon l'une des méthodes suivantes :

- 5 • par réduction alkylative entre une amine portant le groupe R_6 et un aldéhyde portant le groupe R_7 . On opère de préférence dans un solvant chloré (par exemple le dichloromethane, le chloroforme, le dichloro-1,2-éthane etc... [J. Org. Chem., 1996, pp. 3849-3862]) ou dans tout autre solvant organique compatible avec la réaction (par exemple du tétrahydrofuranne), en présence de triacétoxyborohydrure de sodium, 10 cyanoborohydrure de sodium ou ses dérivés (par exemple le cyanoborohydrure de lithium) [J. Am. Chem. Soc., 1971, pp. 2897-2904] et d'acide acétique.
- 15 • ou bien par substitution d'un groupe partant porté par R_6 , par une amine portant le groupe R_7 . A titre d'exemple de groupe partant, on peut citer les atomes d'halogène (Br, Cl, I) ou les substituants tosyl, mésyl, etc... On opère de préférence en présence d'un réactif basique, par exemple du carbonate de sodium, de la potasse, de la soude 15 de la triéthylamine etc..., dans un alcool (par exemple l'éthanol) au reflux [J. Am. Chem. Soc., 1996, pp. 8524-8530]
- 20 • ou bien par couplage entre un acide gras (ou ses dérivés comme les chlorures d'acide gras par exemple) et une amine grasse. L'amide obtenu est alors réduit par un hydrure, par exemple l'hydrure de lithium aluminium ou tout autre hydrure connu de l'homme du métier, dans un éther (par exemple le tétrahydrofuranne (THF), le *t*-butylméthyléther (TBME), le diméthoxyéthane (DME), etc...).
- 25 b) Lorsque R représente un groupement de formule générale (VIII), on effectue le couplage peptidique entre le groupement Q et $H-[NH-(CH_2)_x]_yCOOH$. Le couplage peptidique est effectué selon les méthodes classiques connues de l'homme du métier (Bodanski M., *Principles and Practices of peptide Synthesis*, Ed. Springe-Verlag) ou par toute méthode analogue connue. Notamment, la réaction peut s'effectuer en présence d'une base non-nucléophile dans des solvants aprotiques convenables (comme le chloroforme, la diméthylformamide, la méthylpyrrolidone, l'acétonitrile,

le dichlorométhane etc...), à température comprise entre 0 et 100 °C, le pH étant ajusté entre 9 et 11.

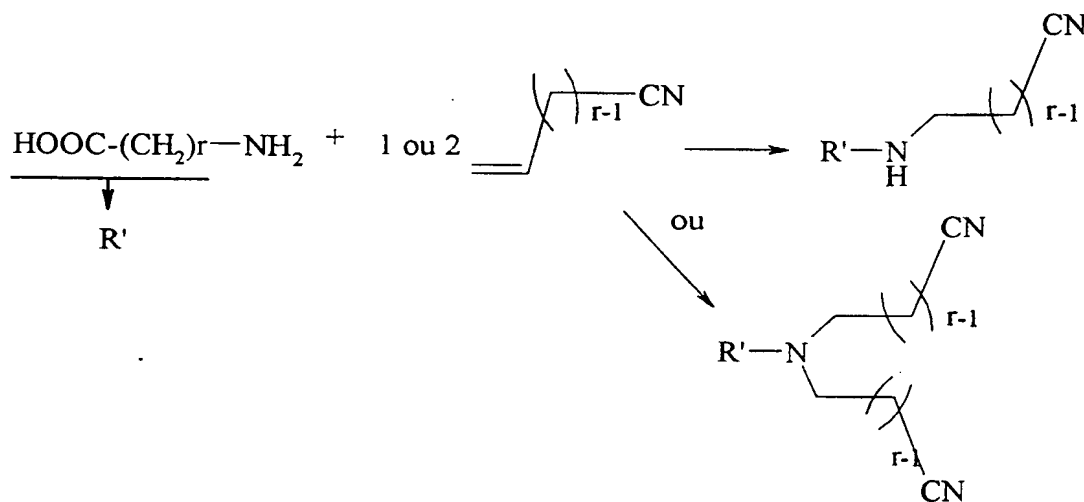
Q est soit disponible commercialement, soit lorsque Q représente un groupement C(O)R8 avec R8 de formule (IX), il peut être synthétisé par réaction entre un chloroformiate commercial (par exemple le cholestérylchloroformiate) ou obtenu selon les méthodes classiques connues de l'homme du métier à partir d'un chloroformiate commercial, et une diamine commerciale (par exemple la N-éthylènediamine) ou obtenue selon les méthodes classiques connues de l'homme du métier. De préférence, on opère dans un solvant chloré (par exemple le dichlorométhane, le chloroforme, le dichloro-1,2-éthane etc...) ou dans tout autre solvant organique compatible avec la réaction comme par exemple le diméthylformamide, le diméthylsulfoxyde, l'acétonitrile etc...

Le groupement H-[NH-(CH₂)_x]_y-COOH est un acide aminé commercial lorsque y est égal à 1, ou bien est obtenu par une ou plusieurs réactions de cyanoéthylation selon les méthodes décrites ci-après dans la synthèse de Rep lorsque y est supérieur à 1.

2) Synthèse de la brique Rep :

Le groupement Rep est obtenu par cyanoéthylation ou par dicyanoéthylation (selon que l'on souhaite obtenir une structure de Rep linéaire ou branchée) d'un acide aminé de formule HOOC-(CH₂)_r-NH₂ puis par réduction des fonctions nitriles en amines.

a) mono- ou di-cyanoéthylation :



- De préférence, on opère en milieu aqueux basique. Par exemple, la réaction est effectuée dans des solvants comme l'eau, les alcools (par exemple le méthanol, l'éthanol etc...) en présence d'une base telle que la soude, la potasse, la triéthylamine etc... Dans le cas de la monocynoéthylation, on travaille de préférence à froid [J. Am. Chem. Soc., 1950, pp. 2599-2603]. Dans le cas de la dicyanoéthylation, on travaille de préférence à chaud et avec un excès d'acrylonitrile [J. Am. Chem. Soc., 1951, pp. 1641-1644]
- b) La réduction des fonctions nitriles en amines est effectuée par hydrogénation catalytique en milieu basique ou par toute autre méthode connue de l'homme du métier. A titre d'exemple, on peut utiliser de l'oxyde de platine ou encore du nickel de Raney [J. Org. Chem., 1988, pp. 3108-3111] comme catalyseur. De préférence, le solvant choisi est un alcool (par exemple le méthanol, l'éthanol etc...) en présence d'une base, par exemple de la soude, de la potasse etc...

3) Synthèse de la brique Rep-R :

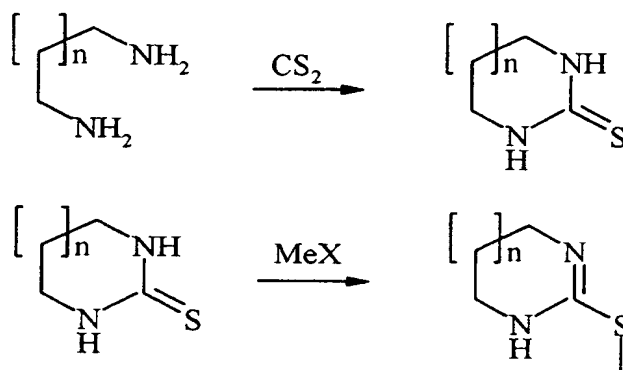
- La brique Rep-R est obtenu par couplage peptidique entre l'acide Rep et l'amine R obtenus aux étapes précédentes.
- Le couplage peptidique est effectué selon les méthodes classiques connues de l'homme du métier (Bodanski M., *Principles and Practices of peptide Synthesis*, Ed. Springer-Verlag) ou par toute méthode analogue connue. Notamment, la réaction peut s'effectuer en présence d'une base non-nucléophile dans des solvants aprotiques convenables (comme le chloroforme, la diméthylformamide, la méthylpyrrolidone, l'acétonitrile, le dichlorométhane etc...), à température comprise entre 0 et 100 °C, le pH étant ajusté entre 9 et 11.

4) Synthèse des composés selon l'invention CA-Rep-R :

- Les composés selon l'invention sont obtenus selon plusieurs méthodes possibles :
- a) par couplage en milieu basique entre l'amine terminale présente sur Rep-R obtenu à l'étape précédente, et CA-S-CH₃, selon les méthodes classiques connues de l'homme du métier. On opère de préférence dans un solvant chloré (par exemple le dichlorométhane, le chloroforme etc...) ou dans d'autres solvants organiques compatibles avec la réaction comme par exemple l'eau, les alcools, le

diméthylformamide etc..., en présence d'une base (par exemple la triéthylamine, la soude, la potasse, la N-éthyl-diisopropylamine etc...). et à température ambiante (20°C environ).

- La brique CA-S-CH₃ est soit disponible commercialement (c'est le cas par exemple de l'hydroiodure de 2-méthylthio-2-imidazoline), soit elle peut être obtenue par action d'un disulfure de carbone sur une diamine appropriée (c'est-à-dire choisie en fonction du groupement cycloamidine qu'on souhaite obtenir), suivie d'une méthylation. Par exemple, le schéma réactionnel peut être illustré de la façon suivante :



- De préférence, le processus réactionnel est mis en oeuvre dans un alcool (par exemple l'éthanol). L'étape de méthylation est effectuée par action d'un halogénométhyle, l'atome d'halogène pouvant être par exemple un atome d'iode [J. Am. Chem. Soc., 1956, pp. 1618-1620 et Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, pp. 351-354].
- b) par cyclisation interne du groupement cycloamidine à partir des fonctions amino présentes sur Rep-R, par action d'hydrogénosulfate d'O-méthylisourée ou de semisulfate de S-méthylisothiourée. De préférence, on opère en milieu aqueux en présence d'une base à chaud [J. Med. Chem., 1985, pp. 694-698 et J. Med. Chem., 1996, pp. 669-672]. A titre de solvant préféré, on peut citer les mélanges eau/alcool ou le diméthylformamide. A titre de base, on peut utiliser la triéthylamine, la N-éthyl-diisopropylamine, la soude, la potasse etc... La température est comprise de préférence entre 40°C et 60°C, et encore plus préférentiellement, la réaction est mise en oeuvre à 50°C.

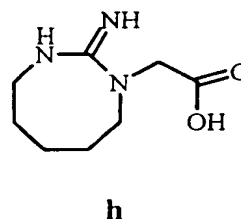
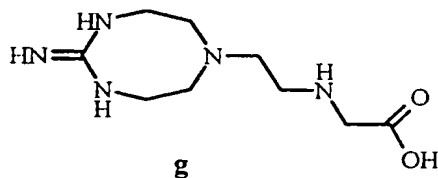
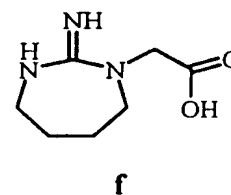
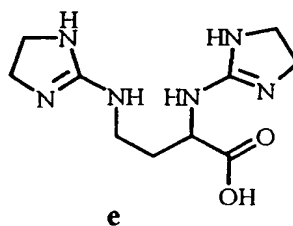
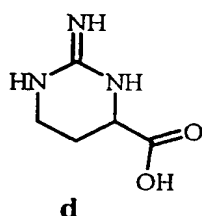
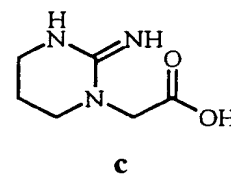
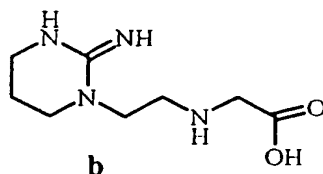
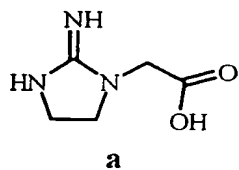
BEST AVAILABLE COPY

c) par couplage peptidique entre CA-COOH et Rep-R selon les méthodes classiques connues de l'homme du métier, comme décrit précédemment.

La brique CA-COOH peut être obtenue de différentes manières :

- par action d'une brique CA-S-CH₃ sur un acide aminé ou un acide polyaminé selon les méthodes connues de l'homme du métier ou par tout autre méthode analogue [J. Am. Chem. Soc., 1956, pp. 1618-1620]. La brique CA-S-CH₃ est obtenue de la même façon que précédemment, et l'acide aminé ou polyaminé est choisi en fonction du composé selon l'invention souhaité, ou bien
- par action d'un S,S-diméthyl-tosyl-iminothiocarbonimide ou de l'un de ses dérivés sur un acide polyaminé selon les méthodes connues de l'homme du métier ou par tout autre méthode analogue [J. Org. Chem., 1971, pp. 46-48]. De préférence on opère en milieu éthanolique en présence d'une base (par exemple la soude) et à la température de reflux du mélange.

A titre d'exemple de briques CA-COOH pouvant être obtenues par l'une des méthodes décrites ci-dessus, on peut citer les briques suivantes :



Dans toutes les réactions exposées précédemment, lorsque les substituants amino présents dans les différents groupements peuvent interférer avec les réactions mises en oeuvre, il est préférable de les protéger préalablement par des radicaux compatibles pouvant être mis en place et éliminés sans toucher au reste de la molécule.

- 5 A titre d'exemple, les radicaux protecteurs peuvent être choisis parmi les radicaux décrits par T.W. GREENE, *Protective Groups in Organic Synthesis*, J. Wiley-Interscience Publication (1991) ou par McOmie, *Protective Groups in Organic Chemistry*, Plenum Press (1973).

- 10 Un autre objet de l'invention concerne une composition comprenant au moins un composé de formule (I) tel que défini précédemment. En particulier un autre objet selon la présente invention comprend un composé de formule (I) tel que défini ci-avant et un acide nucléique. Lorsque un composé selon l'invention et un acide nucléique sont mis en présence, ils forment un complexes par interaction entre les charges positives présentes à pH physiologique sur le composé selon l'invention et les charges
- 15 négatives de l'acide nucléique. Ce complexe est appelé « complexe nucléolipidique » dans toute la suite. Préférentiellement, le composé selon l'invention et l'acide nucléique sont présents en quantités telles que le rapport des charges positives du composé sur les charges négatives de l'acide nucléique soit compris entre 0,1 et 50, de préférence entre 0,1 et 20. Ce rapport peut être ajusté aisément par l'homme du métier en
- 20 fonction du composé utilisé, de l'acide nucléique, et des applications recherchées (notamment du type de cellules à transfecter).

- On entend au sens de l'invention par « acide nucléique » aussi bien un acide désoxyribonucléique qu'un acide ribonucléique. Il peut s'agir de séquences naturelles ou artificielles, et notamment d'ADN génomique (ADNg), d'ADN complémentaire
- 25 (ADNc), d'ARN messenger (ARNm), d'ARN de transfert (ARNt), d'ARN ribosomique (ARNr), de séquences hybrides ou de séquences synthétiques ou semi-synthétiques, d'oligonucléotides modifiés ou non. Ces acides nucléiques peuvent être d'origine humaine, animale, végétale, bactérienne, virale, etc... Ils peuvent être obtenus par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par criblage de banques, par
- 30 synthèse chimique, ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification

BEST AVAILABLE COPY

chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage de banques. Ils peuvent être modifiés chimiquement.

Concernant plus particulièrement les acides désoxyribonucléiques, ils peuvent être simple ou double brin de même que des oligonuléotides courts ou des séquences plus longues. En particulier, les acides nucléiques sont avantageusement constitués par des plasmides, des vecteurs, des épisomes, des cassettes d'expression, etc... Ces acides désoxyribonucléiques peuvent porter une origine de réplication fonctionnelle ou non dans la cellule cible, un ou plusieurs gènes marqueurs, des séquences régulatrices de la transcription ou de la réplication, des gènes d'intérêt thérapeutique, des séquences antisens modifiées ou non, des régions de liaison à d'autres composants cellulaires, etc...

De préférence, l'acide nucléique comprend une cassette d'expression constituée d'un ou plusieurs gènes d'intérêt thérapeutique sous contrôle d'un ou plusieurs promoteurs et d'un terminateur transcriptionnel actifs dans les cellules cibles.

On entend au sens de l'invention par « cassette d'expression d'un gène d'intérêt » un fragment d'ADN qui peut être inséré dans un vecteur à des sites de restriction spécifiques. Le fragment d'ADN comprend une séquence d'acide nucléique codant pour un ARN ou un polypeptide d'intérêt et comprend en outre les séquences nécessaires à l'expression (enhanceur(s), promoteur(s), séquences de polyadénylation etc...) de ladite séquence. La cassette et les sites de restriction sont conçus pour assurer une insertion de la cassette d'expression dans un cadre de lecture approprié pour la transcription et la traduction.

Il s'agit généralement d'un plasmide ou d'un épisome portant un ou plusieurs gènes d'intérêt thérapeutique. A titre d'exemple on peut citer les plasmides décrits dans les demandes de brevet WO 96/26270 et WO 97/10343 incorporées à la présente par référence.

Au sens de l'invention, on entend par gène d'intérêt thérapeutique notamment tout gène codant pour un produit protéique ayant un effet thérapeutique. Le produit

protéique ainsi codé peut être notamment une protéine ou un peptide. Ce produit protéique peut être exogène homologue ou endogène vis-à-vis de la cellule cible, c'est-à-dire un produit qui est normalement exprimé dans la cellule cible lorsque celle-ci ne présente aucune pathologie. Dans ce cas, l'expression d'une protéine permet par exemple de pallier une expression insuffisante dans la cellule ou l'expression d'une protéine inactive ou faiblement active en raison d'une modification, ou encore de surexprimer ladite protéine. Le gène d'intérêt thérapeutique peut aussi coder pour un mutant d'une protéine cellulaire, ayant une stabilité accrue, une activité modifiée, etc... Le produit protéique peut également être hétérologue vis-à-vis de la cellule cible. Dans ce cas, une protéine exprimée peut par exemple compléter ou apporter une activité déficiente dans la cellule, lui permettant de lutter contre une pathologie, ou stimuler une réponse immunitaire.

Parmi les produits thérapeutiques au sens de la présente invention, on peut citer plus particulièrement les enzymes, les dérivés sanguins, les hormones, les lymphokines : interleukines, interférons, TNF, etc... (FR 92/03120), les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs ou leurs précurseurs ou enzymes de synthèse, les facteurs trophiques (BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, HARP/pléiotrophine, etc...) les apolipoprotéines (ApoAI, ApoAIV, ApoE, etc..., FR 93/05125), la dystrophine ou une minidystrophine (FR 91/11947), la protéine CFTR associée à la mucoviscidose, les gènes suppresseurs de tumeurs (p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, etc..., FR 93/04745), les gènes codant pour des facteurs impliqués dans la coagulation (Facteurs VII, VIII, IX), les gènes intervenant dans la réparation de l'ADN, les gènes suicides (thymidine kinase, cytosine déaminase), les gènes de l'hémoglobine ou d'autres transporteurs protéiques, les enzymes du métabolisme, catabolisme etc...

L'acide nucléique d'intérêt thérapeutique peut également être un gène ou une séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de gènes ou la transcription d'ARNm cellulaires. De telles séquences peuvent, par exemple, être transcrites dans la cellule cible en ARN complémentaires d'ARNm cellulaires et bloquer ainsi leur traduction en protéine, selon la technique

décrite dans le brevet EP 140 308. Les gènes thérapeutiques comprennent également les séquences codant pour des ribozymes, qui sont capables de détruire sélectivement des ARN cibles (EP 321 201).

Comme indiqué plus haut, l'acide nucléique peut également comporter un ou plusieurs gènes codant pour un peptide antigénique, capable de générer chez l'homme ou l'animal une réponse immunitaire. Dans ce mode particulier de mise en oeuvre, l'invention permet la réalisation soit de vaccins soit de traitements immunothérapeutiques appliqués à l'homme ou à l'animal, notamment contre des microorganismes, des virus ou des cancers. Il peut s'agir notamment de peptides antigéniques spécifiques du virus d'Epstein Barr, du virus HIV, du virus de l'hépatite B (EP 185 573), du virus de la pseudo-rage, du "syncytia forming virus", d'autres virus ou encore de peptides antigéniques spécifiques de tumeurs (EP 259 212).

Préférentiellement, l'acide nucléique comprend également des séquences permettant l'expression du gène d'intérêt thérapeutique et/ou du gène codant pour le peptide antigénique dans la cellule ou l'organe désiré. Il peut s'agir des séquences qui sont naturellement responsables de l'expression du gène considéré lorsque ces séquences sont susceptibles de fonctionner dans la cellule infectée. Il peut également s'agir de séquences d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs des gènes E1A, MLP, CMV, RSV, etc... En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, etc... Il peut aussi s'agir de promoteur, inductible ou répressible.

Par ailleurs, l'acide nucléique peut également comporter, en particulier en amont du gène d'intérêt thérapeutique, une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible. Cette séquence signal peut être la séquence signal naturelle du produit thérapeutique, mais il peut

également s'agir de toute autre séquence signal fonctionnelle, ou d'une séquence signal artificielle. L'acide nucléique peut également comporter une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique synthétisé vers un compartiment particulier de la cellule.

Les compositions selon l'invention peuvent en outre comporter un ou plusieurs adjuvants capables de s'associer aux complexes formés entre le composé selon l'invention et l'acide nucléique, et d'en améliorer le pouvoir transfectant. Dans un autre mode de mise en oeuvre, la présente invention concerne donc des compositions comprenant un acide nucléique, un composé de formule (I) tel que défini ci-avant et un ou plusieurs adjuvants capables de s'associer aux complexes nucléolipidiques composé (I)/acide nucléique et d'en améliorer le pouvoir transfectant. La présence de ce type d'adjuvants (lipides, peptides ou protéines par exemple) peut permettre avantageusement d'augmenter le pouvoir transfectant des composés.

Dans cette optique, les compositions de l'invention peuvent comprendre comme adjuvant, un ou plusieurs lipides neutres. De telles compositions sont particulièrement avantageuses, notamment lorsque le rapport de charges R est faible. La Demanderesse a en effet montré que l'addition d'un lipide neutre permet d'améliorer la formation des particules nucléolipidiques et de favoriser la pénétration de la particule dans la cellule en déstabilisant sa membrane.

Plus préférentiellement, les lipides neutres utilisés dans le cadre de la présente invention sont des lipides à deux chaînes grasses. De manière particulièrement avantageuse, on utilise des lipides naturels ou synthétiques, zwitterioniques ou dépourvus de charge ionique dans les conditions physiologiques. Il peuvent être choisis plus particulièrement parmi la dioleoylphosphatidyléthanolamine (DOPE), l'oléoylpalmitoylphosphatidyléthanolamine (POPE), les di-stéaroyl, -palmitoyl, -mirystoyl phosphatidyléthanolamines ainsi que leurs dérivé N-méthylés 1 à 3 fois, les phosphatidylglycérols, les diacylglycérols, les glycosyldiacylglycérols, les cérébrosides (tels que notamment les galactocérébrosides), les sphingolipides (tels que notamment les sphingomyélines) ou encore les asialogangliosides (tels que notamment les asialoGM1 et GM2).

Ces différents lipides peuvent être obtenus soit par synthèse soit par extraction à partir d'organes (exemple : le cerveau) ou d'oeufs, par des techniques classiques bien connues de l'homme du métier. En particulier, l'extraction des lipides naturels peut être réalisée au moyen de solvants organiques (voir également Lehninger, Biochemistry).

5 Plus récemment, la demanderesse a démontré qu'il était également particulièrement avantageux d'employer à titre d'adjuvant, un produit intervenant ou non directement au niveau de la condensation de l'acide nucléique (WO 96/25508). La présence d'un tel produit, au sein d'une composition selon l'invention, permet de diminuer la quantité de composé de formule (I), avec les conséquences bénéfiques qui
10 en découlent sur le plan toxicologique, sans porter un préjudice quelconque à l'activité transfectante. Par produit intervenant au niveau de la condensation de l'acide nucléique, on entend définir un produit compactant, directement ou non, l'acide nucléique. Plus précisément, ce produit peut soit agir directement au niveau de l'acide nucléique à transfecter soit intervenir au niveau d'un produit annexe qui lui est
15 directement impliqué dans la condensation de cet acide nucléique. De préférence, il agit directement au niveau de l'acide nucléique. Par exemple, le produit précompactant peut être n'importe quel polycation, par exemple la polylysine. Selon un mode de réalisation préféré, ce produit intervenant au niveau de la condensation de l'acide nucléique dérive en tout ou partie d'une protamine, d'une histone, ou d'une nucléoline
20 et/ou de l'un de leurs dérivés. Un tel produit peut également être constitué, en tout ou partie, de motifs peptidiques (KTPKKAKKP) et/ou (ATPAKKAA), le nombre des motifs pouvant varier entre 2 et 10. Dans la structure du composé selon l'invention, ces motifs peuvent être répétés de manière continue ou non. C'est ainsi qu'ils peuvent être séparés par des liens de nature biochimique, par exemple par un ou plusieurs
25 acides aminés, ou de nature chimique.

Préférentiellement, les compositions de l'invention comprennent de 0,01 à 20 équivalents d'adjuvant(s) pour un équivalent d'acides nucléiques en mol/mol et, plus préférentiellement, de 0,5 à 5.

Dans un mode de réalisation particulièrement avantageux, les compositions de la présente invention comprennent en outre un élément de ciblage permettant d'orienter le transfert de l'acide nucléique. Cet élément de ciblage peut être un élément de ciblage extracellulaire permettant d'orienter le transfert de l'ADN vers certains, 5 types cellulaires ou certains tissus souhaités (cellules tumorales, cellules hépatiques, cellules hématopoiétiques...). Il peut également s'agir d'un élément de ciblage intracellulaire permettant d'orienter le transfert de l'acide nucléique vers certains compartiments cellulaires privilégiés (mitochondries, noyau etc...). L'élément de ciblage peut être lié au composé selon l'invention ou également à l'acide nucléique 10 comme cela a été précisé précédemment.

Parmi les éléments de ciblage utilisables dans le cadre de l'invention, on peut citer les sucres, les peptides, les protéines, les oligonucléotides, les lipides, les neuromédiateurs, les hormones, les vitamines ou leurs dérivés. Préférentiellement, il s'agit de sucres de peptides ou de protéines tels que des anticorps ou des fragments 15 d'anticorps, des ligands de récepteurs cellulaires ou des fragments de ceux-ci, des récepteurs ou des fragments de récepteurs, etc... En particulier, il peut s'agir de ligands de récepteurs de facteurs de croissance, de récepteurs de cytokines, de récepteurs de type lectines cellulaires, ou de ligands à séquence RGD avec une affinité pour les récepteurs de protéines d'adhésion comme les intégrines. On peut également citer les 20 récepteurs de la transferrine, des HDL et des LDL, ou le transporteur du folate. L'élément de ciblage peut également être un sucre permettant de cibler des lectines tels que les récepteurs aux asialoglycoprotéines ou aux sialydés tel que le sialyde Lewis X, ou encore un fragment Fab d'anticorps, ou un anticorps simple chaîne (ScFv).

L'association des éléments de ciblage aux complexes nucléolipidiques de 25 l'invention peut être effectuée par toute technique connue de l'homme du métier, par exemple par couplage à une partie hydrophobe ou à une partie qui interagit avec l'acide nucléique du composé de formule générale (I) selon l'invention, ou encore à un groupement qui interagit avec le composé de formule générale (I) selon l'invention ou avec l'acide nucléique. Les interactions en question peuvent être, selon un mode 30 préféré, de nature ionique ou covalente.

BEST AVAILABLE COPY

Selon une autre variante, les compositions de l'invention peuvent aussi incorporer au moins un agent de surface non-ionique en quantité suffisante pour stabiliser la taille des particules de complexes nucléolipidiques composé de formule générale (I)/acide nucléique. L'introduction d'agents de surface non-ionique prévient la formation d'agrégats, ce qui rend la composition plus particulièrement adaptée à une administration *in vivo*. Les compositions selon l'invention incorporant de tels agents de surface présentent un avantage sur le plan de l'innocuité. Elles présentent également un avantage supplémentaire en ce sens qu'elles diminuent le risque d'interférences avec d'autres protéines compte tenu de la réduction de la charge globale des compositions de complexes nucléolipidiques.

Les agents de surface sont constitués avantageusement d'au moins un segment hydrophobe, et d'au moins un segment hydrophile. Préférentiellement, Le segment hydrophobe est choisi parmi les chaînes aliphatiques, les polyoxyalkylène, les polyester d'alkylidène, les polyéthylène glycol à tête polyéther benzylique et le cholestérol, et le segment hydrophile est avantageusement choisi parmi les polyoxyalkylène, les alcools polyvinyliques, les polyvinylpyrrolidones ou les saccharides. De tels agents de surface non-ioniques ont été décrits dans la demande WO 98/34648.

L'invention a également pour objet l'utilisation des composés de formule générale (I) tels que définis ci-avant pour fabriquer un médicament destiné à soigner les maladies par transfert d'acides nucléiques (et plus généralement de polyanions) dans les cellules primaires ou dans les lignées établies. Il peut s'agir en particulier de cellules fibroblastiques, musculaires, nerveuses (neurones, astrcytes, cellules glyales), hépatiques, de la lignée hématopoïétique (lymphocytes, CD34, dendritiques etc...), épithéliales, etc..., sous forme différenciées ou pluripotentes (précurseurs).

Une telle utilisation est particulièrement avantageuse car les composé de formule générale (I) selon l'invention présentent une cytotoxicité réduite par rapport aux lipides cationiques de l'art antérieur. La Demanderesse a notamment mis en évidence qu'à des rapports de charges très élevés entraînant habituellement la mort des animaux consécutivement à la transfection, aucune cytotoxicité apparente n'était

décelée. Les composés selon l'invention peuvent être utilisés notamment pour la transfection *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo* d'acides nucléiques. Pour des utilisations *in vivo*, par exemple en thérapie ou pour l'étude de la régulation de gènes ou la création de modèles animaux de pathologies, les compositions selon l'invention peuvent être formulées en vue d'administrations par voie topique, cutanée, orale, rectale, vaginale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, intratrachéale, intrapéritonéale, etc... De préférence, les compositions de l'invention contiennent un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe au niveau de l'organe désiré, ou pour une administration par voie topique (sur peau et/ou muqueuse). Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. Les doses d'acide nucléique utilisées pour l'injection ainsi que le nombre d'administrations peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. En ce qui concerne plus particulièrement le mode d'administration, il peut s'agir soit d'une injection directe dans les tissus, par exemple au niveau des tumeurs, ou les voies circulatoires, soit d'un traitement de cellules en culture suivi de leur réimplantation *in vivo*, par injection ou greffe. Les tissus concernés dans le cadre de la présente invention sont par exemple les muscles, la peau, le cerveau, les poumons, le foie, la rate, la moelle osseuse, le thymus, le coeur, la lymphe, le sang, les os, les cartilages, le pancréas, les reins, la vessie, l'estomac, les intestins, les testicules, les ovaires, le rectum, le système nerveux, les yeux, les glandes, les tissus conjonctifs, etc... Avantageusement, les tissus transfectés sont les muscles et les poumons.

L'invention concerne en outre une méthode de transfert d'acides nucléiques dans les cellules comprenant les étapes suivantes :

- (1) la mise en contact de l'acide nucléique avec un composé de formule générale (I) tel que défini ci-avant, pour former un complexe nucléolipidique, et

(2) la mise en contact des cellules avec le complexe nucléolipidique formé en (1).

La mise en contact des cellules avec le complexe nucléolipidique peut être réalisée par incubation des cellules avec ledit complexe (pour des utilisations *in vitro* ou *ex vivo*), ou par injection du complexe dans un organisme (pour des utilisations *in vivo*). L'incubation est réalisée de préférence en présence de par exemple de 0,01 à 1000 µg d'acide nucléique pour 10⁶ cellules. Pour une administration *in vivo*, des doses d'acide nucléique comprises entre 0,01 et 10 mg peuvent par exemple être utilisées.

Dans le cas où les compositions de l'invention contiennent en outre un ou plusieurs adjuvants tels que définis précédemment, le ou les adjuvants sont préalablement mélangés au composé de formule générale (I) selon l'invention ou bien à l'acide nucléique.

La présente invention fournit ainsi une méthode particulièrement avantageuse pour le traitement des maladies par administration d'un acide nucléique codant pour une protéine ou pouvant être transcrit en un acide nucléique apte à corriger ladite maladie, ledit acide nucléique étant associé à un composé de formule générale (I) tel que défini précédemment, dans les conditions définies ci-avant. Plus particulièrement, cette méthode est applicable aux maladies résultant d'une déficience en un produit protéique ou nucléique, l'acide nucléique administré codant pour ledit produit protéique ou étant transcrit en un produit nucléique ou encore constituant ledit produit nucléique.

L'invention s'étend à toute utilisation d'un composé de formule (I) selon l'invention pour la transfection *in vivo*, *ex vivo*, ou *in vitro* de cellules.

Outre les dispositions qui précèdent, la présente invention comprend également d'autres caractéristiques et avantages qui ressortiront des exemples et figures qui suivent, et qui doivent être considérés comme illustrant l'invention sans en limiter la portée. Notamment, la Demanderesse propose à titre non-limitatif divers protocoles opératoires ainsi que des intermédiaires réactionnels susceptibles d'être mis en oeuvre

pour préparer les composés de formule générale (I). Bien entendu, il est à la portée de l'homme du métier de s'inspirer de ces protocoles et/ou produits intermédiaires pour mettre au point des procédures analogues en vue de conduire à d'autres composés de formule générale (I) selon l'invention.

5 **FIGURES**

Figure 1 : Structure des vecteurs synthétiques dénommé lipide A, lipide B, lipide c et lipide D dans la présente invention et décrits dans la demande de brevet WO 97/18185 incorporée à la présente par référence.

Figure 2 : Représentation schématique du plasmide pXL2774.

- 10 Figures 3 : Diagramme de phase des complexes nucléolipidiques composé (1)/ADN. La liaison du composé (1) à l'ADN a été déterminée en suivant la diminution de la fluorescence (en %, 100% étant la fluorescence de l'ADN nu) du bromure d'éthidium (EtBr) (symbole ●, ligne pleine), comme décrit selon l'axe y situé à droite. La taille des particules de complexes (en nm) est indiquée sur l'axe y situé à gauche. L'axe x
- 15 représente le rapport de charge agents de transfert/ADN. La taille des complexes nucléolipidiques sans co-lipide est représenté par le symbole ■ en ligne pleine. La taille des complexes nucléolipidiques contenant 25% de cholestérol est représenté par le symbole □ en ligne discontinue. La taille des complexes nucléolipidiques contenant 40% de DOPE est représenté par le symbole ◆ en ligne discontinue. La
- 20 méthode ne permet pas de déterminer la taille des particules au delà de 3 µm.

Figure 4 : Activité de transfert de gène *in vitro* dans des cellules HeLa des complexes nucléolipidiques contenant le composé (1) selon la présente invention sans co-lipide (barre du milieu en gris foncé), avec 25% de cholestérol (barre de gauche en gris moyen), et avec 40% molaire de DOPE (barre de droite en gris clair),

25 comparativement à l'ADN nu. Seuls les complexes nucléolipidiques dans lesquels l'ADN est complètement saturé en composé selon l'invention et dont la taille est comprise entre 100 nm et 300 nm ont été utilisés.

Figure 5 : Activité de transfert de gène *in vitro* des complexes nucléolipidiques formés à partir du composé (3), dans des cellules HeLa. En ordonnée figure l'expression de la luciférase, exprimée en pg par puit transfecté. En abscisse, figure le rapport de charges entre le composé (3) et l'ADN en nmol/μg. L'expression a été mesurée à chaque fois pour des formulations sans co-lipide (micelles), avec DOPE et avec du cholestérol.

Figure 6 : Activité de transfert de gène *in vitro* des complexes nucléolipidiques formés à partir du composé (5), dans des cellules HeLa. En ordonnée figure l'expression de la luciférase, exprimée en pg par puit transfecté. En abscisse, figure le rapport de charges entre le composé (5) et l'ADN en nmol/μg. L'expression a été mesurée à chaque fois pour des formulations sans co-lipide (micelles), avec DOPE et avec du cholestérol.

Figure 7 : Activité de transfert de gène *in vitro* des complexes nucléolipidiques formés à partir du composé (6), dans des cellules HeLa. En ordonnée figure l'expression de la luciférase, exprimée en pg par puit transfecté. En abscisse, figure le rapport de charges entre le composé (6) et l'ADN en nmol/μg. L'expression a été mesurée à chaque fois pour des formulations sans co-lipide (micelles), avec DOPE et avec du cholestérol.

Figure 8 : Activité de transfert de gène *in vivo* après injection directe dans le muscle des complexes contenant le composé (1) selon la présente invention ou le composé de formule $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COArgN}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$ (appelé « lipide A » dans toute la suite) sans co-lipide (barre en gris foncé), avec 25% de cholestérol (barre en gris moyen), et avec 40% molaire de DOPE (barre en gris clair), comparativement à l'ADN nu. Seuls les complexes dans lesquels l'ADN est complètement saturé en lipide et dont la taille est comprise entre 100 nm et 300 nm ont été utilisés.

Figure 9 : L'importance de l'invention est illustrée en comparant l'activité de transfert de gène de deux lipides différents, le composé (1) selon l'invention et le lipide A, et de l'ADN nu via deux routes d'administration : par voie intraveineuse (iv) et par voie

intramusculaire (im). Seuls les complexes dans lesquels l'ADN est complètement saturé en lipide et dont la taille est comprise entre 100 nm et 300 nm ont été utilisés.

Figure 10 : Activité de transfert de gène *in vivo* 48 heures après injection i.m. des complexes nucléolipidiques contenant les composés (5) ou (6) selon la présente invention sans co-lipide et à rapport de charge 0,25/1, comparativement à l'ADN nu. L'expression est exprimée en pg de luciférase par ml. En partant de la gauche, les barres représentent : (a) contrôle négatif ; (b) ADN nu ; (c) Composé (5) et (d) composé (6).

10 MATERIEL ET METHODES

A\ MATERIEL

- Les acides aminés, polyaminés (ou leur dérivés) de départ sont disponibles commercialement. C'est le cas par exemple de la N-(3-aminopropyl)glycine, N-(2-cyanoethyl)glycine, ou encore de l'acide 2,4-diaminobutyric, ou peuvent être synthétisées par des méthodes classiques connue de l'homme du métier.
- Les isothiourées cycliques sont également des produits commerciaux, comme par exemple l'hydroiodure de 2-méthylthio-2-imidazoline, ou peuvent être synthétisées par des méthodes classiques connues de l'homme du métier.
- Les amines substituées par un/des lipide(s) sont commerciales ou bien synthétisées à partir des amines et aldéhydes correspondants par réduction alkylative.
- Les produits tels que la triéthylamine, l'acide trifluoroacétique, l'hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yloxytris(diméthylamino)phosphonium (BOP), la diméthylaminopyridine (DMAP), le chloroformate de benzyle, le dicarbonate de di-*tert*-butyle sont des produits commerciaux. Les solutions de chlorure de sodium et de carbonate de sodium sont saturées. La solution de sulfate de potassium est concentrée à 0,5 M.

BEST AVAILABLE COPY

B\ METHODES

1) Mesures Physiques.

Les spectres de RMN Proton ont été enregistrés sur des spectromètres Bruker 400 et 600 MHZ.

- 5 Les spectres de masse ont été réalisés sur un API-MS/III.

2) Méthodes de purification et d'analyse

a) Conditions de chromatographie en phase directe

- Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été effectuées sur des plaques de gel de silice Merck de 0,2 mm d'épaisseur.

- 10 Elles sont révélées soit aux U.V. (254 nm), à la ninhydrine, en vaporisant (spray léger) une solution éthanolique de ninhydrine (40 mg/100 cm³ d'éthanol) pour révéler les amines ou les amides en chauffant à 150°C, à la fluorescamine, en vaporisant une solution (40 mg/100 cm³ d'acétone) pour révéler les amines primaires, au vert de bromocrésol, en vaporisant une solution (0,1 % dans le propanol-2) pour révéler les
15 acides, à la vanilline en vaporisant (spray léger) une solution éthanolique de vanilline (3 %) avec 3 % d'acide sulfurique suivi d'un chauffage à 120°C, ou à l'iode en recouvrant la plaque de poudre d'iode.

- Les chromatographies sur colonne ont été effectuées sur gel de silice 60 Merck de granulométrie 0,063-0,200 mm.

- 20 b) Conditions de purification CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance) préparative

L'appareillage est un ensemble pour la chromatographie en phase liquide en mode gradient permettant une détection U.V. Cette chaîne préparative est composée des éléments suivants :

- 25 Pompe A : GILSON modèle 305 équipée d'une tête 50 SC.

Pompe B : GILSON modèle 303 équipée d'une tête 50 SC.

Boucle d'injection : 5 ml.

Module de pression : GILSON modèle 806.

Mélangeur : GILSON modèle 811 C équipé d'une tête de 23 ml.

Détecteur UV : GILSON modèle 119 équipé d'une cellule préparative.

Collecteur de fraction : GILSON modèle 202 équipé de portoirs n° 21 et de tube en verre de 10 ml.

5 Intégrateur : SHIMADZU modèle C-R6A.

Colonne : Colonne C4 (10 mm) en acier inoxydable de 25 cm de longueur et de 2.2 cm de diamètre commercialisée par VYDAC modèle 214 TP 1022.

La solution de produit à purifier est chargée sur la colonne par l'intermédiaire de la boucle d'injection, l'éluat est recueilli par fractions de un tube en 30 secondes. Le

10 détecteur est réglé aux longueurs d'onde de 220 nm et 254 nm.

les phases mobiles sont ainsi définie :

<u>Solvant A</u>		<u>Solvant B</u>	
Eau déminéralisée	2500 cm ³	Acétonitrile pour HPLC	2500 cm ³
Acide trifluoroacétique	2 cm ³	Acide trifluoroacétique	2,5 cm ³

Gradient :

Temps en minutes	% de solvant A	% de solvant B	Débit en cm ³ /min
0	90	10	18
10	90	10	18
110	0	100	18
120	0	100	18

c) Techniques de chromatographie Analytique

15 - Les analyses CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance) ont été réalisées sur un appareil Merck-Hitachi équipé d'un intégrateur calculateur D 2500 HITACHI, d'un autosampler AS-2000A, d'une pompe intelligent L-6200A, et d'un détecteur UV-vis L-4000 avec longueur d'onde réglable mise à 220 nm.

Les colonnes pour les séparations analytiques sont des colonnes Browlee en acier inoxydable de 3 cm de longueur et de 0,46 cm de diamètre commercialisées par

20 APPLIED BIOSYSTEM.

La phase stationnaire est constituée par de l'Aquapore Butyl 7 micron. Les phases mobiles sont l'eau (avec de l'acide trifluoroacétique) et l'acétonitrile (avec de l'acide trifluoroacétique). Les injections sont de 20 µl d'une solution d'environ 1 mg/cm³ dans une vanne à boucle de 0,1 cm³. Le débit pour les analyses est réglé entre 1 cm³/min et 4 cm³/min. La pression est de 180 bars environ.

Les conditions de séparation sont résumées ci-dessous :

<u>Solvant A</u>		<u>Solvant B</u>	
Eau déminéralisée	2500 cm ³	Acétonitrile pour HPLC	2500 cm ³
Acide trifluoroacétique	2 cm ³	Acide trifluoroacétique	2.5 cm ³

10 Gradient :

Temps en minutes	% de solvant A	% de solvant B	Débit en cm ³ /minute
0	60	40	1
3	60	40	1
20	0	100	1
35	0	100	1
35.1	60	40	4
36.1	60	40	4
36.2	60	40	2
44	60	40	2

EXEMPLES

A\ SYNTHÈSES DES COMPOSÉS SELON L'INVENTION

Exemple 1 : synthèse du composé (1) (N-dioctadécylcarbamoylméthyl-2-{3-[4-(2-imino-tétrahydro-pyrimidin-1-yl)-butylamino]-propylamino}-acétamide) à partir du lipide cationique de formule condensée $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COglyN}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$ appelé « lipide B » dans la suite (dont la préparation a été décrite dans la demande de brevet WO 97/18185 et dont la structure est représentée à la figure 1).

Dans un ballon équipé d'un barreau magnétique, on dissout 0,784 mmol de lipide B dans 25 cm³ de méthanol, et on ajoute 10,21 mmol de triéthylamine. Puis on coule lentement (5 minutes) sur le mélange une solution de O-Methylisourée et d'acide sulfurique (1,173 mmol) dans de l'eau (9 cm³). Le mélange est maintenu à 50°C dans un bain d'huile pendant vingt heures.

Ensuite, le mélange est concentré à sec au rotoévaporateur. On solubilise l'extrait sec avec une solution d'eau (4 cm³), d'éthanol (4 cm³), et d'acide trifluoroacétique (1 cm³). Cette solution est injectée en deux fois en CLHP préparative.

Les fractions intéressantes (déterminées par CLHP analytique) sont regroupées, congelées et lyophilisées. On obtient ainsi 194 mg (0,163 mmol) de produit salifié.

Rendement : 20,8 %

CLHP analytique : Rt = 15,99 minutes.

Spectre de RMN ¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO d₆, δ en ppm) : 0,88 (t, J = 6,5 Hz, 6H : CH₃ des chaînes grasses) ; 1,24 (mt, 60H : CH₂ centraux des chaînes grasses) ; de 1,35 à 1,70 (mt, 4H : 1 CH₂ de chaque chaîne grasse) ; 1,57 (mt, 4H : (CH₂)₂ centraux du butyle) ; 1,88 et 1,96 (2 mts, 2H chacun : CH₂ central du propyle et CH₂ central du cycle) ; de 2,85 à 3,35 (2 mts, 16H en totalité : les 8 NCH₂) ; 3,81 (s large, 2H : NCH₂CON) ; 4,03 (d, J = 5 Hz, 2H : CONCH₂CON du glycycle) ; 7,25 et 7,84 (respectivement s et s large, 1H chacun : les 2 NH du cycle) ; 8,61 (t, J = 5,5 Hz, 1H : NHCO) ; 8,70 et 9,02 (2 mfs, 1H chacun : les 2 NH).

MH⁺ = 846

Exemple 2 : synthèse du composé (2) (N-ditétradécylcarbamoylméthyl-2-{3-[4-(2-imino-tétrahydro-pyrimidin-1-yl)-butylamino]-propylamino}-acétamide) à partir du composé de formule condensée NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COGlyN[(CH₂)₁₃CH₃]₂ appelé « lipide C » dans la suite (dont la préparation a été décrite dans la demande de brevet WO 97/18185 et dont la structure est représentée à la figure 1).

Dans un ballon équipé d'un barreau magnétique on dissout 1,036 mmol de lipide C dans 30 cm³ de méthanol, et on ajoute 13,13 mmol de triéthylamine. Puis on coule

lentement (5 minutes) sur le mélange une solution de O-Méthylisourée et d'acide sulfurique (1,554 mmol) dans de l'eau (9 cm³). Le mélange est maintenu à 50°C dans un bain d'huile pendant une vingtaine d'heures. Puis, le mélange est concentré à sec au rotoévaporateur. On solubilise l'extrait sec avec une solution d'eau (3 cm³), d'éthanol (2 cm³), et d'acide trifluoroacétique (0,5 cm³). Cette solution est injectée en CLHP préparative.

Les fractions intéressantes (déterminées par CLHP analytique) sont regroupées, congelées et lyophilisées. On obtient finalement 218 mg (0,2022 mmol) de produit salifié.

10 Rendement : R = 19,5 %

CLHP_{analytique} : Rt = 10.76 minutes.

Spectre de RMN ¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO d₆, δ en ppm) : 0,88 (t, J = 7 Hz, 6H : CH₃ des chaînes grasses) ; de 1,15 à 1,40 (mt, 44H : (CH₂)₁₁ centraux des chaînes grasses) ; 1,45 et de 1,50 à 1.65 (2 mts, 2H chacun : 1 CH₂ de chaque chaîne grasse) ; 1,59 (mt, 4H : les 2 CH₂ centraux du butyle) ; 1,91 et 1,97 (2 mts, 2H chacun : CH₂ central des propyles) ; de 2,85 à 3,10 (mt, 10H : les 2 NCH₂ du butyle - les 2 NCH₂ d'un des 2 propyles - et 1 des 2 NCH₂ de l'autre propyle) ; 3,23 et de 3,30 à 3,50 (2 mts, respectivement 5H et 1H : l'autre NCH₂ de l'autre propyle et NCH₂ des chaînes grasses) ; 3,79 (mf, 2H : NCH₂CON) ; 4,03 (d, J = 5 Hz, 2H : CONCH₂CON du glycycle) ; 7.27 et de 8,40 à 9,30 (respectivement s large et mf, 2H et 4H : NH₂⁺ CF₃COO⁻, NH⁺ CF₃COO⁻ et =NH) ; 7,88 et 8,61 (respectivement s et s large, 1H chacun : respectivement NHC=N et CONH).

MH⁺ = 734

Exemple 3 : synthèse du composé (3) (2-(3-{4-[3-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-ylamino)-propylamino]-butylamino}-propylamino)-N-ditétradécylcarbamoyleméthyl-acétamide) à partir du lipide C (voir exemple 2 et figure 1 pour sa structure).

Dans un ballon équipé d'un compte-bulle et d'un barreau magnétique, on dissout 0,36 mmol de iodure de 2-méthylmercapto-2-imidazolinium dans 0,36 cm³ de soude 1N. A cette solution on ajoute 0,36 mmol de lipide C préalablement dissout dans 1,44 cm³ de soude 1N, 5 cm³ d'eau, et 4 cm³ d'éthanol. Le mélange est maintenu sous

agitation jusqu'à l'arrêt de dégagement de méthyl mercaptan (24 heures). Le mélange est ensuite concentré à sec au rotoévaporateur. On solubilise l'extrait sec avec une solution d'eau (4 cm³), d'éthanol (4 cm³), et de d'acide trifluoroacétique (0,5 cm³). Cette solution est injectée en deux fois en CLHP préparative.

- 5 Les fractions intéressantes (déterminées par CLHP analytique) sont regroupées, congelées et lyophilisées. On obtient finalement 213 mg (0,1727 mmol) de produit salifié.

Rendement : R = 48 %

HPLC_{analytique} : Rt = 8,90 minutes.

- 10 Spectre de RMN ¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO d₆ avec ajout de quelques gouttes de CD₃COOD d₄, δ en ppm) : 0,87 (t, J = 7 Hz, 6H : CH₃ des chaînes grasses) ; de 1,15 à 1,40 (mt, 44H : (CH₂)₁₁ centraux des chaînes grasses) ; 1,45 et 1,55 (2 mts, 2H chacun : 1 CH₂ de chaque chaîne grasse) ; 1,65 (mt, 4H : les 2 CH₂ centraux du butyle) ; de 1,80 à 1,95 (mt, 4H : CH₂ central des propyles) ; de 2,80 à 3,05 (mt, 10H :
15 les 2 NCH₂ du butyle - les 2 NCH₂ d' un des 2 propyles - et 1 des 2 NCH₂ de l'autre propyle) ; 3,24 (mt, 6H : l'autre NCH₂ de l'autre propyle et NCH₂ des chaînes grasses) ; 3,56 (s, 2H : NCH₂CON) ; 3,62 (s, 4H : NCH₂CH₂N) ; 4,02 (d, J = 5 Hz, 2H : CONCH₂CON du glycyle).

MH⁺ = 777

- 20 Exemple 4 : Synthèse du composé (4) (2-(3-{bis-[3-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-ylamino)-propyl]-amino}-propylamino)-N-ditétradécylcarbamoylméthyl-acetamide) par la méthode de synthèse de « briques ».

I) SYNTHÈSE DU BOC-GLY-DITÉTTRADÉCYLAMINE

(a)

- Le groupement Gly dont les amines sont protégées par des groupements Boc
25 (10 mmol) et la ditétradécylamine (10 mmol) sont introduit dans un ballon de 250 ml, et on ajoute 100 cm³ de dichlorométhane. Le mélange est agité jusqu'à dissolution complète. 30 mmol de N-éthyl-diisopropylamine (DIEA) et 11 mmol de phosphonium de benzotriazol-1-yloxytrisdiméthylamine (BOP) sont ensuite ajoutés. Le pH est maintenu à 10 grâce au DIEA, et le mélange est agité pendant 2 heures. Lorsque la
30 réaction est achevée, (suivie par CCM et/ou CLHP), le dichlorométhane est évaporé et

le solide obtenu est repris dans l'acétate d'éthyle (300 cm³). La phase organique est lavée avec une solution de sulfate de potassium (4 fois 100 cm³), de carbonate de sodium (4 fois 100 cm³), et de chlorure de sodium (4 fois 100 cm³). La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous vide.

- 5 Le produit (a) est obtenu avec un rendement de 93 %.

CCM : R_f = 0,9 (CHCl₃/MeOH, 9:1)

MH⁺ : 567

II) SYNTHÈSE DE [Z-NH(CH₂)₃]₂-N-(CH₂)₃-NH-Boc-CH₂-COOH (b)

1) Synthèse de NC-(CH₂)₂-NH-Boc-CH₂-COOH (c)

- 10 L'amine de la N-(cyanoéthyl)-glycine (0,1 mol/amine, commerciale) est solubilisée dans de la soude 1N (200 cm³/amine) et du dioxane (200 cm³). La solution est agitée dans un bain de glace, puis on ajoute goutte à goutte une solution de O-(*t*-butoxycarbonyl)₂ ou de p-chlorobenzoyloxycarbonyle (ClZ, 0,14 mol/amine) dans 200 cm³ de dioxane. Le pH est maintenu à une valeur
- 15 supérieure à 9. Puis le mélange est agité à environ 20°C pendant une nuit. Le dioxane est évaporé sous vide, puis on acidifie le mélange à pH 3 à l'aide d'une solution de sulfate de potassium. Ce qui est insoluble est extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 fois 100 cm³) puis lavé avec une solution de chlorure de sodium (2 fois 100 cm³). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et
- 20 évaporée sous vide. Le produit (c) de formule NC-(CH₂)₂-NH-Boc-CH₂-COOH est obtenu avec un rendement de 98%.

CCM : R_f = 0,66 (CHCl₃/MeOH, 8:2)

MH⁺ : 229

2) Synthèse de NH₂-(CH₂)₃-NH-Boc-CH₂-COOH (d)

- 25 Dans un autoclave en inox de 1 litre, on introduit 50 mmol de produit (c) de formule NC-(CH₂)₂-NH-Boc-CH₂-COOH. On prépare en même temps dans un bêcher une solution de 10 cm³ d'éthanol (95 %) et de 3,3 g de soude (80 mol). Lorsque la soude est dissoute, on introduit 2 cm³ de Nickel de raney sur charbon. L'autoclave est fermé. La pression initiale d'hydrogénation est de
- 30 52 bar environ, et elle descend à environ 48,5 bar en une nuit à température ambiante (20°C). La suspension est filtrée sur papier, le filtre est lavé à l'éthanol

(4 fois 25 cm³), et les filtrats sont concentrés à sec sous vide. On obtient le produit (d) qui est utilisé sans autre purification dans la suite.

CCM : R_f = 0,12 (CHCl₃/MeOH, 6:4)

MH⁺ : 233

5 **3) Synthèse de [NC(CH₂)₂]₂-N-(CH₂)₃-NH-Boc-CH₂-COOH (e)**

Dans un ballon, le produit (d) de formule NH₂-(CH₂)₃-NH-Boc-CH₂-COOH (0,05 mol) et de la soude (0,1 mol) sont solubilisés dans 150 cm³ d'eau. La solution est refroidie dans un bain de glace. Sous vive agitation, on coule lentement de l'acrylonitrile (0,12 mol) en gardant la température de la masse inférieure à 20°C. Le mélange de réaction est maintenu une nuit à température ambiante (20°C). Puis le mélange est maintenu à 50°C pendant 2 heures. Le solvant est évaporé sous vide, puis le mélange est acidifié à pH 3 avec une solution de sulfate de potassium. Ce qui est insoluble est extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 fois 200 cm³), puis lavé avec une solution de chlorure de sodium (2 fois 100 cm³). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, puis filtrée et évaporée sous vide. Le « brut » est éventuellement purifié sur une colonne de silice. On obtient le produit (e) avec un rendement de 50%.

CCM : R_f = 0,75 (CHCl₃/MeOH, 6:4)

MH⁺ : 339

20 **4) Synthèse de [Z-NH-(CH₂)₃]₂-N-(CH₂)₃-NH-Boc-CH₂-COOH (b)**

Dans un autoclave en inox de 1 litre, on introduit le produit (e) de formule [NC(CH₂)₂]₂-N-(CH₂)₃-NH-Boc-CH₂-COOH (50 mmol). On prépare en même temps dans un bêcher une solution de 10 cm³ d'éthanol (95 %) et de 3,3 g de soude (80 mol). Lorsque la soude est dissoute, on introduit cette solution dans l'autoclave. Un courant d'azote est passé dans l'autoclave et on introduit 2 cm³ de Nickel de Raney sur charbon. L'autoclave est fermé. La pression initiale d'hydrogénation est de 52 bar environ, et elle descend à 48,5 bar environ en une nuit à température ambiante (20°C). La suspension est filtrée sur papier, le filtre est lavé avec de l'éthanol (4 fois 25 cm³), et les filtrats sont concentrés à sec sous vide. On obtient un solide blanc qui est utilisé sans autres purifications après une analyse CCM.

BEST AVAILABLE COPY

CCM: $R_f = 0,14$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 6:4)

Le solide obtenu précédemment est solubilisé dans de la soude 1N (200 cm^3 /amine) et du dioxane (200 cm^3). La solution est agitée dans un bain de glace, puis on ajoute goutte à goutte une solution de (*t*-butoxycarbonyl)₂O ou de p-chlorobenzoyloxycarbonyl (0,14 mol/amine) dans 200 cm^3 de dioxane. Le pH est maintenu à une valeur supérieure à 9. Puis, le mélange est agité à température ambiante (20°C) pendant une nuit. Le dioxane est évaporé sous vide, puis on acidifie le mélange à pH 3 à l'aide d'une solution de sulfate de potassium. Ce qui est insoluble est extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 fois 100 cm^3) puis lavé avec une solution de chlorure de sodium (2 fois 100 cm^3). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous vide. Les produits sont analysés par CCM et/ou CLHP.

Le Produit brut est purifié sur une colonne de silice (dichlorométhane/méthanol, 8:2).

On obtient le produit (b) avec un rendement de 66% par rapport au produit (d).

CCM: $R_f = 0,42$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 6:4)

MH⁺: 615

III) SYNTHÈSE DE $[\text{Z-NH}(\text{CH}_2)_3]_2\text{-N}-(\text{CH}_2)_3\text{-NH-Boc-CH}_2\text{-COGlyN}[(\text{CH}_2)_{13}\text{-CH}_3]_2$ (f)

Le produit (a) dont les amines sont protégées par des groupements Boc (1 mmol) est introduit dans un ballon équipé d'un barreau magnétique. 30 cm^3 d'acide trifluoroacétique à 4°C sont ajoutés, puis la solution est agitée pendant une heure. Lorsque la réaction est achevée (suivi par CCM et/ou CLHP), l'acide trifluoroacétique est évaporé sous vide puis le produit est séché par coévaporation avec 3 fois 30 cm^3 d'éther éthylique.

CLHP: $R_t = 12,86$ min, ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$: 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]).

Le produit obtenu (Gly-ditétradécylamine, 10 mmol) et le produit (b) (10 mmol) sont introduit dans un ballon de 250 cm^3 , du dichlorométhane (100 cm^3) est ajouté et le mélange est agité jusqu'à dissolution complète. 30 mmol de N-éthyl-diisopropylamine

(DIEA) et 11 mmol d'hexafluorophosphate de BOP sont ensuite ajoutés. Le pH est maintenu à 10 grâce au DIEA et le mélange est agité pendant deux heures. Lorsque la réaction est achevée (suivi par CCM et/ou CLHP), le dichlorométhane est évaporé et le solide obtenu est repris dans de l'acétate d'éthyle (300 cm³). La phase organique est lavée avec une solution de sulfate de potassium (4 fois 100 cm³), de carbonate de sodium (4 fois 100 cm³), et de chlorure de sodium (4 fois 100 cm³). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous vide. Les produits sont utilisés sans autres purifications. Le produit (f) est obtenu avec un rendement de 75 % après purification sur une colonne de silice (dichlorométhane/méthanol, 8:2).

CCM : R_f = 0,86 (CHCl₃/MeOH, 8:2)

CLHP : R_t = 17,44 min, (H₂O/MeCN : 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]).

IV) SYNTHÈSE DE [NH₂(CH₂)₃]₂-N-(CH₂)₃-NH-Boc-CH₂-COGlyN[(CH₂)₁₃-CH₃]₂ (g)

Le produit (f) dont les amines sont protégées, est introduit dans un ballon équipé d'un barreau magnétique et dissous dans 10 cm³ de méthanol par gramme de produit. Du palladium sur charbon (10 %, 1g/g de produit) et du formiate d'ammonium (1 g/g de produit) sont ajoutés à température ambiante. L'hydrogénolyse est suivie par CLHP. Après deux heures, la réaction est achevée, le mélange est filtré, et le filtre lavé avec 3 fois 10 cm³ de méthanol par gramme de produit. De l'eau bi-distillée est ajoutée et la solution est congelée et lyophilisée, ou bien le filtrat est concentré à sec et le solide est repris dans de l'acétate d'éthyle (300 cm³). La phase organique est lavée par une solution de carbonate de sodium (2 fois 100 cm³), et une solution de chlorure de sodium (2 fois 100 cm³), puis elle est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous vide. Les produits sont analysés par CLHP et sont utilisés sans autres purifications. Le produit (g) est obtenu avec un rendement de 40 % par rapport au produit (f).

CLHP : R_t = 9,62 min, (H₂O/MeCN : 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]).

MH⁺ : 795.

V) SYNTHÈSE DU COMPOSÉ (4)

le produit (g) qui contient l'amine primaire à modifier (1 mmol/amine) est solubilisé dans du dichlorométhane (10 cm³), puis on ajoute de l'hydroiodure de 2-méthylimidazole 5 imidazoline (1,2 mmol/amine) et de la triéthylamine (1,3 mmol/amine). Le mélange est agité à température ambiante (20 °C) jusqu'à l'arrêt du dégagement de sulfure de méthyle. A la fin de la réaction (suivie par CLHP), le dichlorométhane est évaporé sous vide.

Le produit obtenu, dont les amines sont protégées par des groupements Boc, (1 mmol) 10 est introduit dans un ballon équipé d'un barreau magnétique. 30 cm³ d'acide trifluoroacétique à 4°C sont ajoutés, puis la solution est agitée pendant une heure. Lorsque la réaction est achevée (suivi par CCM et/ou CLHP), l'acide trifluoroacétique est évaporé sous vide puis le produit est séché par coévaporation avec 3 fois 30 cm³ d'éther éthylique.

15 Le produit obtenu est purifié par CLHP préparative et les fractions analysées par CLHP. On obtient ainsi le composé (4) selon la présente invention avec un rendement de 34 %.

CLHP : R_t = 10,07 min, (H₂O/MeCN : 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]).

20 Spectre de R M N ¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO d₆ à une température de 383K, d en ppm) : 0,92 (t, J = 7 Hz, 6H : CH₃ des chaînes grasses) ; de 1,25 à 1,45 (mt, 44H : (CH₂)₁₁ centraux des chaînes grasses) ; 1,57 (mt, 4H : 1 CH₂ de chaque chaîne grasse) ; de 1,70 à 1,90 (mt, 6H : CH₂ central des propyles) ; de 2,50 à 3,40 (mt, 16H : les 2 NCH₂ des propyles et les NCH₂ des chaînes grasses) ; 3,68 (s, 8H : les 2 NCH₂CH₂N) 25 ; 3,72 (s large, 2H : NCH₂CON) ; 4,06 (s, 2H : CONCH₂CON du glycyle).

MH⁺ : 831

Exemple 5 : Synthèse du composé (5) : (N-ditétradécylcarbamoylméthyl-2-{3-[3-(1,4,5,6-tétrahydropyrimidin-2-ylamino)-propylamino]propylamino}-acetamide) par la méthode de synthèse de « briques ».

I) SYNTHÈSE DU BOC-GLY-DITÉTRADECYLAMINE (a)

On opère de la même façon que dans l'exemple précédent. Le produit (a) est obtenu avec un rendement de 93 %.

CCM: $R_f = 0,9$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 9:1)

5 MH^+ : 567

II) SYNTHÈSE DE Z-NH(CH₂)₃-N-Boc-(CH₂)₃-N-Boc-CH₂-COOH (b)1) Synthèse de NC-(CH₂)₂-NH-Boc-CH₂-COOH (c)

On opère de la même façon que précédemment dans l'exemple 4. Le produit (c) est obtenu avec un rendement de 98 %.

10 CCM: $R_f = 0,66$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 8:2)

MH^+ : 229

2) Synthèse de NH₂-(CH₂)₃-NH-Boc-CH₂-COOH (d)

Le produit (d) est obtenu de la même façon que précédemment dans l'exemple 4.

CCM: $R_f = 0,12$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 6:4)

15 MH^+ : 233

3) Synthèse de NC(CH₂)₂-N-Boc-(CH₂)₃-NH-Boc-CH₂-COOH (e)

Dans un ballon, le produit (d) (0,05 mol) et de la soude (0,1 mol) sont solubilisés dans 150 cm³ d'eau. La solution est refroidie dans un bain de glace. Sous vive agitation, on coule lentement de l'acrylonitrile (0,05 mol) en gardant la température de la masse inférieure à 20°C. Le mélange de réaction est maintenu une nuit à température ambiante (20°C).

20 Le solvant est évaporé sous vide, puis le mélange est acidifié à pH 3 avec une solution de sulfate de potassium. Ce qui est insoluble est extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 fois 200 cm³), puis lavé avec une solution de chlorure de sodium (2 fois 100 cm³). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, puis filtrée et évaporée sous vide. Le produit obtenu est éventuellement purifié sur une colonne de silice.

25 Le produit obtenu (0,1 mol/amine) est solubilisé dans de la soude 1N (200 cm³/amine) et du dioxane (200 cm³). La solution est agitée dans un bain de glace, puis on ajoute goutte à goutte une solution de (Boc)₂O ou de p-

30

chlorobenzyloxycarbonyl (0,14 mol/amine) dans 200 cm³ de dioxane. Le pH est maintenu à une valeur supérieure à 9. Puis, le mélange est agité à température ambiante (20°C) pendant une nuit. Le dioxane est évaporé sous vide, puis on acidifie le mélange à pH 3 à l'aide d'une solution de sulfate de potassium. Ce qui est insoluble est extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 fois 100 cm³) puis lavé avec une solution de chlorure de sodium (2 fois 100 cm³). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous vide. Les produits sont analysés par CCM et/ou CLHP.

Le produit (e) est ainsi obtenu avec un rendement est de 93 %.

10 CCM : R_f = 0,75 (CHCl₃/MeOH, 8:2)

MH⁺ : 386

4) Synthèse de Z-NH-(CH₂)₃-N-Boc-(CH₂)₃-N-Boc-CH₂-COOH (b)

Dans un autoclave en inox de 1 litre, on introduit le produit (e) (50 mmol). On prépare en même temps dans un bêcher une solution de 10 cm³ d'éthanol (95 %) et de 3,3 g de soude (80 mmol). Lorsque la soude est dissoute, on introduit cette solution dans l'autoclave. Un courant d'azote est passé dans l'autoclave et on introduit 2 cm³ de Nickel de Raney sur charbon. L'autoclave est fermé. La pression initiale d'hydrogénation est de 52 bar environ, et elle descend à 48,5 bar environ en une nuit à température ambiante (20°C). La suspension est filtrée sur papier, le filtre est lavé avec de l'éthanol (4 fois 25 cm³), et les filtrats sont concentrés à sec sous vide. On obtient un solide blanc qui est utilisé sans autres purifications après une analyse CCM.

20 CCM : R_f = 0,14 (CHCl₃/MeOH, 6:4)

Le produit obtenu (0,1 mol/amine) est solubilisé dans de la soude 1N (200 cm³/amine) et du dioxane (200 cm³). La solution est agitée dans un bain de glace, puis on ajoute goutte à goutte une solution p-chlorobenzyloxycarbonyl (0,14 mol/amine) dans 200 cm³ de dioxane. Le pH est maintenu à une valeur supérieure à 9. Puis, le mélange est agité à température ambiante (20°C) pendant une nuit. Le dioxane est évaporé sous vide, puis on acidifie le mélange à pH 3 à l'aide d'une solution de sulfate de potassium. Ce qui est insoluble est extrait avec

de l'acétate d'éthyle (3 fois 100 cm³) puis lavé avec une solution de chlorure de sodium (2 fois 100 cm³). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous vide. Le produit obtenu est purifié sur une
5 par CCM et/ou CLHP. Le produit (b) est obtenu avec un rendement de 32 % par rapport au produit (d).

CCM : R_f = 0,63 (CHCl₃/MeOH, 9:1)

MH⁺ : 523

III) SYNTHÈSE DU 2-méthylsulfanyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidine (f)

10 Dans un ballon sous agitation et courant d'azote, le 3,4,5,6-tétrahydro-2-pyrimidinethiol (0,0103 mol) est chargé, et 5 cm³ de méthanol et 0,65 cm³ d'iodure de méthyle (0,0105 mol) sont ajoutés. Le mélange est porté au reflux durant 1 heure puis est laissé à refroidir à température ambiante (20°C). Le produit est précipité par ajout de 5 cm³ d'éther éthylique. Le précipité est filtré puis lavé à l'éther éthylique. Le
15 produit est ensuite séché une nuit sous une pression de 34 mbar.

On obtient 1,5 g (0,0041 mol) de produit (VI), soit un rendement de 40 %.

CCM : R_f = 0,25 (CHCl₃/MeOH, 9:1)

MH⁺ : 131

20 d) SYNTHÈSE DE Z-NH(CH₂)₃-N-Boc(CH₂)₃-N-Boc-CH₂-COGlyN[(CH₂)₁₃-CH₃]₂ (g)

Le produit (a) dont les amines sont protégées par des groupements Boc (1 mmol) est introduit dans un ballon équipé d'un barreau magnétique. 30 cm³ d'acide trifluoroacétique à 4°C sont ajoutés, puis la solution est agitée pendant une heure. Lorsque la réaction est achevée (suivi par CCM et/ou CLHP), l'acide trifluoroacétique
25 est évaporé sous vide puis le produit obtenu est séché par coévaporation avec 3 fois 30 cm³ d'éther éthylique.

CLHP : R_t = 12,86 min, (H₂O/MeCN : 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]).

Le produit obtenu (10 mmol) et le produit (b) (10 mmol) sont introduit dans un ballon
30 de 250 cm³. Du dichlorométhane (100 cm³) est ajouté et le mélange est agité jusqu'à

dissolution complète. 30 mmol de DIEA et 11 mmol de BOP sont ensuite ajoutés. Le pH est maintenu à 10 grâce au DIEA et le mélange est agité pendant deux heures. Lorsque la réaction est achevée (suivi par CCM et/ou CLHP), le dichlorométhane est évaporé et le solide obtenu est repris dans de l'acétate d'éthyle (300 cm³). La phase organique est lavée avec une solution de sulfate de potassium (4 fois 100 cm³), de carbonate de sodium (4 fois 100 cm³), et de chlorure de sodium (4 fois 100 cm³). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous vide. Les produits sont utilisés sans autres purifications.

Après purification sur colonne de silice (dichlorométhane/méthanol, 8:2), on obtient le produit (g) avec un rendement de 85%.

CCM : R_f = 0,9 (CHCl₃/MeOH, 9:1)

CLHP : R_t = 19,79 min, (H₂O/MeCN : 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]).

V) SYNTHÈSE DE NH₂(CH₂)₃]₂-N-Boc-(CH₂)₃-NH-Boc-CH₂-COGlyN[(CH₂)₁₃-CH₃]₂ (h)

Le produit (g) est introduit dans un ballon équipé d'un barreau magnétique et dissous dans 10 cm³ de méthanol/g de produit. Du palladium sur charbon (10 %, 1g/g de produit) et du formiate d'ammonium (1 g/g de produit) sont ajoutés à température ambiante (20°C). L'hydrogénolyse est suivie par CLHP. Après deux heures, la réaction est achevée, le mélange est filtré, et le filtre lavé avec 3 fois 10 cm³ de méthanol/g de produit. De l'eau bi-distillée est ajoutée, et la solution est congelée et lyophilisée, ou bien le filtrat est concentré à sec et le solide est repris dans de l'acétate d'éthyle (300 cm³). La phase organique est lavée par une solution de carbonate de sodium (2 fois 100 cm³), et une solution de chlorure de sodium (2 fois 100 cm³), puis elle est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous vide. Les produits sont analysés par CLHP et sont utilisés sans autres purifications. Le produit (h) est obtenu avec un rendement de 93 % par rapport au produit (g).

CCM : R_f = 0,42 (CHCl₃/MeOH, 6:4)

CLHP : R_t = 14,66 min, (H₂O/MeCN : 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]).

MH⁺ : 838

VI) SYNTHÈSE DU COMPOSÉ (5)

Le produit (h) contenant l'amine primaire à modifier (1 mmol/amine) est solubilisé dans du dichlorométhane (10 cm³), puis on ajoute le produit (f) (1,2 mmol/amine) et la triéthylamine (1,3 mmol/amine). Le mélange est agité à température ambiante (20°C) jusqu'à l'arrêt du dégagement de sulfure de méthyle. A la fin de la réaction (suivie par CLHP), le dichlorométhane est évaporé sous vide.

Le produit obtenu est purifié par CLHP préparative et les fractions analysées par CLHP. Le composé (5) est ainsi obtenu avec un rendement de 38 %.

10 CLHP : R_t = 8,42 min, (H₂O/MeCN : 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]).

Spectre de R M N ¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO d₆, δ en ppm) : 0,86 (t, J = 7 Hz, 6H : CH₃ des chaînes grasses) ; de 1,10 à 1,35 (mt, 44H : (CH₂)₁₁ centraux des chaînes grasses) ; 1,44 et 1,53 (2 mts, 2H chacun : 1 CH₂ de chaque chaîne grasse) ; de 1,80 à 2,00 (mt, 6H : CH₂ central des propyles et CH₂ de la 1,4,5,6-tetrahydro-pyrimidine) ; de 2,80 à 3,10 (mt, 10H : NCH₂ des propyles et NCH₂ de la 1,4,5,6-tetrahydro-pyrimidine) ; de 3,15 à 3,45 (mt : les 6H correspondant au =NCH₂ de la 1,4,5,6-tetrahydro-pyrimidine et aux NCH₂ des chaînes grasses) ; 3,81 (mf, 2H : NCH₂CON) ; 4,04 (d, J = 5 Hz, 2H : CONCH₂CON du glycyle) ; 7,89 - 8,62 - 8,75 et 9,01 (4 mfs, 8H en totalité : les échangeables et OH des CF₃COOH).

MH⁺ : 720

Exemple 6 : Synthèse du composé (6) : (N-dioctadécylcarbamoyleméthyl-2-{3-[3-(1,4,5,6-tétrahydropyrimidin-2-ylamino)-propylamino]propylamino}-acetamide) par la méthode de synthèse de « briques ».

25 I) SYNTHÈSE DU BOC-GLY-DITÉTRADECYLAMINE (a)

On opère de la même façon que dans l'exemple précédent. Le produit (a) est obtenu avec un rendement de 93 %.

CCM : R_f = 0,9 (CHCl₃/MeOH, 9:1)

MH⁺ : 567

30 II) SYNTHÈSE DE Z-NH(CH₂)₃-N-Boc-(CH₂)₃-N-Boc-CH₂-COOH (b)

BEST AVAILABLE COPY

1) Synthèse de NC-(CH₂)₂-NH-Boc-CH₂-COOH**(c)**

On opère de la même façon que précédemment dans l'exemple 5. Le produit (c) est obtenu avec un rendement de 98 %.

CCM : R_f = 0,66 (CHCl₃/MeOH, 8:2)

5 MH⁺ : 229

2) Synthèse de NH₂-(CH₂)₃-NH-Boc-CH₂-COOH**(d)**

Le produit (d) est obtenu de la même façon que précédemment dans l'exemple 5.

CCM : R_f = 0,12 (CHCl₃/MeOH, 6:4)

MH⁺ : 233

3) Synthèse de NC(CH₂)₂-N-Boc-(CH₂)₃-NH-Boc-CH₂-COOH**(e)**

On opère de la même façon que précédemment dans l'exemple 5. Le produit (e) est ainsi obtenu avec un rendement est de 93 %.

CCM : R_f = 0,75 (CHCl₃/MeOH, 8:2)

MH⁺ : 386

4) Synthèse de Z-NH-(CH₂)₃-N-Boc-(CH₂)₃-N-Boc-CH₂-COOH**(b)**

On opère de la même façon que précédemment dans l'exemple 5. On obtient un solide blanc qui est utilisé sans autres purifications après une analyse CCM.

CCM : R_f = 0,14 (CHCl₃/MeOH, 6:4)

20 Le produit obtenu est utilisé de la même façon que précédemment afin de protéger l'amine terminale par un groupement benzyloxycarbonyle. Le produit (b) est ainsi obtenu avec un rendement de 32 % par rapport au produit (d).

CCM : R_f = 0,63 (CHCl₃/MeOH, 9:1)

MH⁺ : 523

III) SYNTHÈSE DU 2-méthylsulfanyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidine**(f)**

25 On opère de la même façon que précédemment dans l'exemple 5. On obtient ainsi 1,5 g (0,0041 mol) de produit (f), soit un rendement de 40 %.

CCM : R_f = 0,25 (CHCl₃/MeOH, 9:1)

MH⁺ : 131

IV) SYNTHÈSE DE Z-NH(CH₂)₃-N-Boc(CH₂)₃-N-Boc-CH₂-COGlyN[(CH₂)₁₇-CH₃]₂

30 **(g)**

On opère de la même façon que précédemment dans l'exemple 5. On obtient ainsi le produit (a) dont les groupements Boc ont été clivés.

CLHP : $R_t = 19,44$ min, ($H_2O/MeCN$: 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]).

- 5 Ce produit obtenu est utilisé de la même façon avec le produit (b) que précédemment dans l'exemple 5. Après purification sur colonne de silice (dichlorométhane/méthanol, 8:2), on obtient le produit (g) avec un rendement de 84 %.

CCM : $R_f = 0,9$ ($CHCl_3/MeOH$, 9:1)

- 10 CLHP : $R_t = 23,95$ min., ($H_2O/MeCN$: 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]).

V) SYNTHÈSE DE $NH_2(CH_2)_3]_2-N-Boc-(CH_2)_3-NH-Boc-CH_2-COGlyN[(CH_2)_{17}CH_3]_2$ (h)

On opère de la même façon que précédemment avec l'exemple 5. Le produit (h) est obtenu avec un rendements de 73 % par rapport au produit (g).

- 15 CCM : $R_f = 0,28$ ($CHCl_3/MeOH$, 6:4)

CLHP : $R_t = 20,59$ min, ($H_2O/MeCN$: 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]).

MH⁺ : 838

VI) SYNTHÈSE DU COMPOSÉ (6)

- 20 On opère de la même façon que précédemment à l'exemple 5. Le composé (6) est ainsi obtenu avec un rendement de 68 %.

CLHP : $R_t = 15,83$ min, ($H_2O/MeCN$: 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]).

- 25 Spectre de R M N ¹H (500 MHz, $(CD_3)_2SO$ d₆, δ en ppm) : 0,88 (t, $J = 7$ Hz, 6H : CH_3 des chaînes grasses) ; de 1,15 à 1,35 (mt, 60H : $(CH_2)_{15}$ centraux des chaînes grasses) ; 1,46 et 1,54 (2 mts, 2H chacun : 1 CH_2 de chaque chaîne grasse) ; de 1,80 à 2,00 (mt, 6H : CH_2 central des propyles et CH_2 de la 1,4,5,6-tetrahydro-pyrimidine) ; de 2,85 à 3,05 (mt, 10H : NCH_2 des propyles et NCH_2 de la 1,4,5,6-tetrahydro-pyrimidine) ; de 3,15 à 3,45 (mt : les 6H correspondant au $=NCH_2$ de la 1,4,5,6-tetrahydro-pyrimidine et aux NCH_2 des chaînes grasses) ; 3,81 (mf, 2H :
- 30

NCH₂CON) ; 4,04 (d, J = 5 Hz, 2H : CONCH₂CON du glycyle) ; 7,88, 8,61 - 8,74 et 8,99 (4 mfs, 8H en totalité : les échangeables et OH des CF₃COOH).

MH⁺ : 832

B\ UTILISATION DES AGENTS DE TRANSFECTION SELON L'INVENTION

5 Exemple 7 : préparation de complexes nucléolipidiques

Cet exemple illustre la préparation de complexes nucléolipidiques selon l'invention.

Le composé utilisé dans cet exemple est le composé (1) en solution dans du chloroforme. Des quantités de 10 nmoles de composé (1) (soit 11,8 µg) par µg d'ADN
10 ont été utilisées. Dans certains cas, un co-lipide neutre, Cholestérol ou DOPE, est préalablement mélangé au composé. Un film lipidique fin se forme lorsqu'on évapore le chloroforme à l'aide d'un flux léger d'argon, puis il est réhydraté dans un mélange de dextrose 5% et de chlorure de sodium 20 mM, pendant toute une nuit, à 4°C. Les échantillons sont ensuite traités aux ultrasons pendant 5 minutes, chauffés à 65°C
15 pendant 30 minutes, et enfin traités à nouveau aux ultrasons pendant 5 minutes. On obtient ainsi des suspensions lipidiques qui sont stockées à 4°C jusqu'à leur utilisation.

L'ADN utilisé est le plasmide pXL2774 (figure 2) en solution dans un mélange de dextrose 5% et de chlorure de sodium 20 mM à une concentration de 0,5 mg/ml ou 1,0 mg/ml. Le plasmide pXL2774 possède les caractéristiques suivantes :

- 20 - niveau d'endotoxines inférieur à 50 EU/mg,
- Taux d'ADN superenroulé supérieur à 60%,
- contenu d'ARN, c'est-à-dire d'ARNm, d'ARNt et d'ARN ribosomique, (déterminé par HPLC) inférieur à 5%,
- taux d'ADN chromosomal inférieur à 1%,
- 25 - contenu protéique inférieur à 1%,
- osmolarité inférieure à 15 mosmoles/kg.

On prépare les complexes nucléolipidiques selon l'invention en mélangeant rapidement des volumes égaux de solution d'ADN et de suspension lipidique telles que

décrites ci-dessus. La quantité de composé complexé à l'ADN varie de 0,5 nmoles/ μ g d'ADN à 12 nmoles/ μ g d'ADN.

Exemple 8 : comportement des complexes formés à différent rapport de charge

Cet exemple illustre le comportement des complexes nucléolipidiques selon l'invention à différents rapport de charge. L'impact de l'ajout d'un co-lipide neutre est également illustré.

La taille des complexes a tout d'abord été analysée en mesurant le diamètre hydrodynamique par diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Laser Light Scattering) à l'aide d'un appareil Coulter N4plus. les échantillons sont dilués 20 fois dans une solution contenant 5% de dextrose et 20 mM de chlorure de sodium pour éviter les diffusions multiples. L'effet du groupement cycloamidine, de la composition lipidique, et du rapport de charge sur la taille des complexes nucléolipidiques selon l'invention a ainsi été étudié.

On distingue trois phases possibles lorsqu'on augmente le rapport de charge entre le composé (1) selon l'invention et l'ADN. Ces trois phases déterminent le potentiel thérapeutique du composé (1). La figure 3 illustre ces 3 phases pour le composé (1). On peut observer le même comportement pour d'autres composés selon l'invention.

A faible rapport de charge, l'ADN n'est pas saturé par le composé (1). Il reste encore de l'ADN nu, et les complexes sont globalement chargés négativement. Les particules sont de petite taille (entre 100 et 300 nm). Cette phase est appelée « Phase A ».

Le fait que l'ADN ne soit pas complètement saturé par le composé (1) signifie que l'ADN n'est pas complètement protégé par lui. L'ADN peut donc être soumis aux dégradations par les enzymes (DNAases). Par ailleurs, les complexes étant globalement négatifs, le passage de la membrane cellulaires est difficile. Pour ces raisons, les complexes nucléolipidiques de la phase A sont d'une efficacité beaucoup moins grande en transfection.

A rapport de charge intermédiaire, l'ADN est complètement saturé par le composé (1), et les complexes sont globalement neutres ou légèrement positifs. Cette phase est instable car les répulsions ioniques sont minimales et un phénomène de « crosslinking » peut se produire. La taille des particules est bien au-dessus de la limite de détection par diffusion dynamique de la lumière (très supérieure à 1 µm). Cette phase instable est appelée « phase B ».

Une telle taille de complexes n'est pas adaptée pour des utilisations en injection. Cependant, cela ne signifie pas pour autant que les complexes soient inactifs dans la phase B, mais ils sont seulement sous une formulation qui n'est pas appropriée pour leur injection dans un but pharmaceutique.

A rapport de charge relativement élevé, l'ADN est sur-saturé par le composé (1), et les complexes sont globalement positifs. Du fait des fortes répulsions entre les charges positives, cette phase est stable. Elle est désignée sous le nom de « phase C ». Contrairement à la phase A, les complexes nucléolipidiques sont sous une forme telle que l'ADN est très bien protégé vis-à-vis des enzymes, et leur charge globalement positive facilite le passage de la membrane cellulaire de nature anionique. Les complexes de la phase C sont donc particulièrement adaptés à une utilisation pour le transfert d'acides nucléiques dans les cellules.

En plus du groupement cycloamidine du composé selon l'invention, l'utilisation d'un co-lipide neutre a un fort impact sur la stabilité des complexes, comme cela est illustré figure 3. Les co-lipides ajoutés sont soit du DOPE (lipide cationique/DOPE = 3/2), soit du cholestérol (lipide cationique /cholestérol = 3/1). En général, l'ajout du co-lipide neutre augmente l'instabilité des complexes, ce qui entraîne l'augmentation de la quantité de composé requise pour atteindre la phase C. Ceci est très clairement illustré à la figure 3 lorsqu'on compare le rapport de charge auquel la phase C est atteinte en présence et en l'absence de co-lipide.

Il faut noter que les valeurs du rapport de charge qui délimitent les trois phases A, B et C dépendent du composé utilisé. Ainsi, ces valeurs peuvent varier très fortement d'un composé à l'autre.

Enfin, l'affinité du composé vis-à-vis de l'ADN en fonction du rapport de charge a été étudiée. Pour cela, la réduction de fluorescence après ajout de 3 µg de bromure d'éthidium (EtBr) a été mesurée. En effet, la substitution du bromure d'éthidium de l'ADN par le composé est une indication de liaison à l'ADN.

- 5 La formulation utilisée est diluée 20 fois jusqu'à une concentration finale de 25 µg d'ADN/ml. La fluorescence relative mesurée pour l'ADN nu est définie comme étant 100%. Le taux de liaison avec le composé (1) est représenté par la réduction de la fluorescence relative de l'échantillon. La figure 3 montre que la fluorescence diminue quand le rapport de charge augmente, ce qui signifie qu'une plus grande quantité de
- 10 composé (1) est disponible pour se lier à l'ADN (plus la fluorescence décroît, plus une grande quantité de composé se lie à l'ADN jusqu'à atteindre la saturation).

De cette façon, il a été ainsi montré que l'affinité du composé (1) selon l'invention pour l'ADN est déterminée par le groupement cycloamidine, mais pas par l'addition d'un co-lipide.

15 **Exemple 9 : transfection *in vitro* avec le composé (1)**

Cet exemple illustre la capacité du composé (1) selon l'invention à transfecter l'ADN dans les cellules *in vitro*, comparativement à l'ADN non-formulé.

- Des microplaques de 24 puits sontensemencées avec 60000 cellules HeLa (ATCC) par puit, et transfectées 24 heures plus tard. Des complexes contenant 1 µg
- 20 d'ADN sont dilués dans 0,5 ml de milieu de culture DMEM (Gibco/BRL) en l'absence de sérum, puis ajoutés dans chaque puit. Les cellules sont incubées à 37°C pendant 4 heures. Le milieu contenant les complexes est ensuite enlevé et remplacé par un mélange de DMEM et de 10% de sérum de veau foetal. Puis, les cellules sont à nouveau mises en culture pendant 24 heures. Enfin, les cellules sont lysées et testées
- 25 en utilisant un kit de test de luciférase (Promega) et un luminomètre Dynex MLX.

Les résultats indiqués à la figure 4 soulignent la différence entre les performances de l'ADN nu par rapport aux complexes composé (1)/ADN de l'invention totalement saturés : aucune activité luciférase n'a pu être détectée (sensibilité de l'appareil inférieure à 1 pg par puit) après transfection *in vitro* d'ADN

nu, alors que l'activité de transfert de gène des complexes selon l'invention varie de 200 pg/puit à 8000 pg/puit.

Cet exemple montre donc clairement l'utilisation avantageuse du composé (1) selon l'invention pour la transfection des cellules *in vitro*.

5 **Exemple 10 : transfection *in vitro* avec les composés (3), (5) et (6)**

Cet exemple illustre la capacité des composés (3), (5) et (6) selon l'invention à transférer l'ADN dans les cellules *in vitro*, comparativement à l'ADN non-formulé.

La transfection est effectuée selon le protocole de l'exemple 9 précédent, dans des cellules HeLa. Les résultats sont illustrés aux figures 5, 6 et 7. On observe ainsi
10 que ces 3 composés présentent un bon niveau de transfection *in vitro*.

Exemple 11 : transfection *in vivo* du composé (1)

Cet exemple illustre la capacité du composé (1) selon l'invention à transférer l'ADN dans les cellules *in vivo*, comparativement à l'ADN non-formulé et au lipide A de formule condensée $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COArgN}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
15 décrit dans la demande WO 97/18185 et dont la structure est représentée représenté à la figure 1.

Le transfert de gène *in vivo* a été effectué sur des souris Balb/C par administration intramusculaire et intraveineuse. Les formulations qui ont été comparées sont des formulations d'ADN nu, des formulations contenant le lipide A, ou
20 des formulations contenant le composé (1) selon l'invention.

Dans le cas des injections intramusculaires, chaque souris a reçu 30 µl de formulation contenant 15 µg d'ADN dans le muscle antérieur du tibia. Les tissus sont récupérés 7 jours après l'injection, ils sont congelés et stockés à -80°C en attendant d'effectuer les tests d'activité luciférase. Les mesures d'activité luciférase se font comme dans
25 l'exemple 8.

Dans le cas des injections par voie intraveineuse, chaque souris a reçu 200 µl de formulation contenant 50 µg d'ADN. Les tissus sont récupérés dans ce cas 24 heures après l'injection, puis congelés et stockés de la même façon que précédemment.

Les résultats de transfert de gène *in vivo* sont présentés figure 8 et figure 9. Le rapport entre le composé (1) et l'ADN est de 10 nmoles/ μ g d'ADN. Le rapport entre le lipide A et l'ADN est de 4 nmoles/ μ g d'ADN.

La figure 8 illustre l'activité *in vivo* dans le muscle du composé (1) selon l'invention comparativement à l'ADN nu et au lipide A. On constate que les niveaux d'activité luciférase sont équivalents entre l'ADN nu et le composé (1), ce dernier présentant en outre une activité très améliorée par rapport au lipide A. Les mécanismes de transfert impliqués semblent différents entre l'ADN nu et l'utilisation du composé (1) selon la présente invention. En effet, les complexes selon l'invention utilisés ne contiennent pas d'ADN libre (phase C) et de plus, leurs résultats *in vitro* sont très supérieurs à ceux de l'ADN nu.

La figure 9 compare les activités du composé (1) selon l'invention, de l'ADN nu et du lipide A, par voie intraveineuse et par voie intramusculaire.

On constate que l'efficacité de transfection est à peu près équivalente par voie intraveineuse pour le lipide A et pour le composé (1). Par contre, par voie intramusculaire, l'efficacité de transfection du composé (1) selon l'invention est très nettement supérieure à celle du lipide A.

Par rapport à l'ADN nu, le composé (1) présente une transfection par voie intraveineuse, en plus de la transfection au moins équivalente par voie intramusculaire.

Il apparaît donc que l'efficacité de transfert de l'acide nucléique *in vivo* avec le composé (1) selon l'invention est globalement supérieure à celle avec le lipide A qui est un lipide cationique connu et celle de l'ADN non-formulé.

Enfin, il apparaît que les complexes selon l'invention possèdent l'avantage, par rapport à la transfection d'ADN nu, de protéger l'ADN des dégradations par les nucléases, contribuant ainsi à une amélioration significative de la stabilité des formulations. Les composés de la présente invention peuvent être également utilisés pour protéger l'ADN des détériorations au cours de la lyophilisation, améliorant là encore la stabilité des formulations.

Exemple 12 : transfection *in vivo* des composés (5) et (6)

Cet exemple illustre la capacité des composés (5) et (6) à transférer de l'acide nucléique *in vivo* de façon efficace.

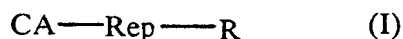
Le même protocole qu'à l'exemple précédent est mis en oeuvre. La figure 10 montre que le composé (5) et le composé (6), formulés dans un rapport de charges 0,25:1 avec l'ADN sans co-lipide, présentent un niveau de transfection *in vivo* supérieur ou égal à l'ADN nu 48 heures après injection en i.m.

Le tableau suivant donne les résultats obtenus avec les composés (5) et (6) dans différentes formulations :

Composé	Rapport de charges composé/ADN	Co-lipide	RLU/poumon	pg/poumon	voie d'administration
Composé (5)	6/1	DOPE (1:1)	254,9	1611,3	i.v.
Composé (5)	8/1	DOPE (1:1)	535,2	3558,1	i.v.
Composé (5)	0,5/1	Chol. (3:1)	209,6	1330,5	i.m.
Composé (5)	0,5/1	DOPE (1:1)	155,8	974,6	i.m.
Composé (6)	6/1	-	175,1	1098,7	i.v.
Composé (6)	5/1	DOPE (1:1)	407,7	2700,8	i.v.
Composé (6)	0,5/1	DOPE (1:1)	1768,7	13005,4	i.m.

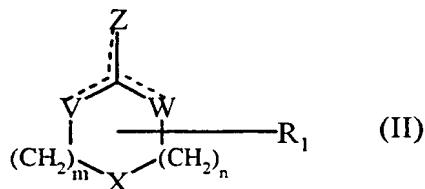
REVENDICATIONS

1. Composés, sous forme D, L ou DL, ainsi que ses sels, de formule générale (I) :



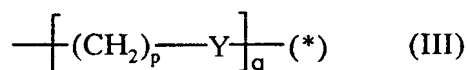
pour laquelle :

- 5 ① CA représente un groupement cycloamidine et ses formes mésomères de formule générale (II) :



pour laquelle :

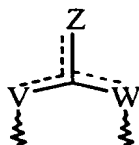
- m, et n sont des entiers indépendants l'un de l'autre compris entre 0 et 3 inclus et tels que m+n est supérieur ou égal à 1,
- R₁ représente un groupement de formule générale (III) :



- pour laquelle p et q sont des entiers indépendants l'un de l'autre compris entre 0 et 10 inclus, Y représente un groupement carbonyle, amino, méthylamino, ou bien méthylène, Y pouvant avoir des significations différentes au sein des différents groupements [(CH₂)_p-Y], et (*) représente soit un atome d'hydrogène, soit est le lieu de liaison au groupement Rep,
- étant entendu que R₁ peut être lié à n'importe quel atome de la formule générale (II), y compris Z, et qu'il y a un unique groupe R₁ dans la formule (II),
- X représente un groupement NR₂ ou bien CHR₂, R₂ étant soit un atome d'hydrogène soit la liaison au groupe R₁ tel que défini précédemment,

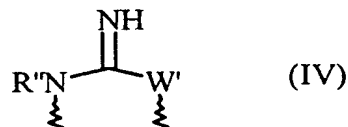
BEST AVAILABLE COPY

- Le groupement



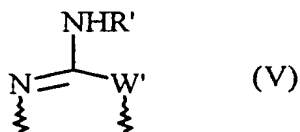
représente :

- * 1^{er} cas : un groupement de formule générale (IV) :



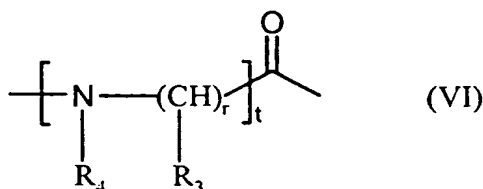
pour laquelle W' représente CHR''' ou bien NR''', et R'' et R''' représentent
5 indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un méthyle, ou la liaison au
groupe R₁ tel que défini précédemment, ou bien

- * 2^{ème} cas : un groupement de formule générale (V) :



pour laquelle W' représente CHR''' ou bien NR''', et R' et R''' représentent
10 indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un méthyle, ou la liaison au
groupe R₁ tel que défini précédemment,

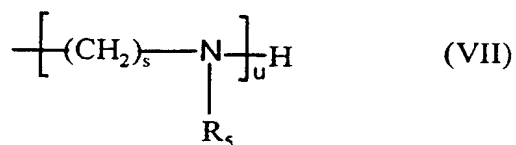
- ② Rep est absent ou est un répartiteur de formule générale (VI) :



dont l'atome d'azote est rattaché aux atomes X, V, W, ou Z ou au substituant Y du
15 groupe R₁ selon les cas, et

- t est un entier compris entre 0 et 8 inclus,
- r est un entier compris entre 0 et 10 inclus, r pouvant avoir des significations différentes au sein des différents groupements -NR₄-(CH)_r,

- R_3 , qui peut avoir des significations différentes au sein des différents groupements $NR_4-(CH)_rR_3$, représente un atome d'hydrogène, un groupement méthyle, ou un groupement de formule générale (VII) :



- 5 pour laquelle u est un entier compris entre 1 et 10 inclus, s est un entier compris entre 2 et 8 inclus pouvant avoir des significations différentes au sein des différents groupements $-(CH_2)_s-NR_5$, et R_5 est un atome d'hydrogène, un groupement CA tel que définis précédemment étant entendu que les groupements CA sont indépendants les uns des autres et peuvent être différents, ou bien un groupement de formule générale
- 10 (VII) étant entendu que les groupements de formule générale (VII) sont indépendants les uns des autres et peuvent avoir des significations différentes,

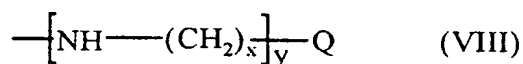
- R_4 est défini de la même façon que R_3 ou bien représente un groupement CA tel que défini précédemment étant entendu que les groupements CA sont indépendants les uns des autres et peuvent être différents, et

- 15 ③ R est lié à la fonction carbonyle du groupement Rep de formule générale (VI), ou bien si Rep est absent R est lié directement au groupement CA, et représente :

- * soit un groupement de formule NR_6R_7 pour laquelle R_6 et R_7 représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un radical aliphatique saturé ou non, linéaire ou ramifiée, éventuellement fluoré, contenant 1 à 22 atomes de
- 20 carbone, avec l'un au moins des deux substituants R_6 ou R_7 différent de l'hydrogène et l'autre contenant entre 10 et 22 atomes de carbone,

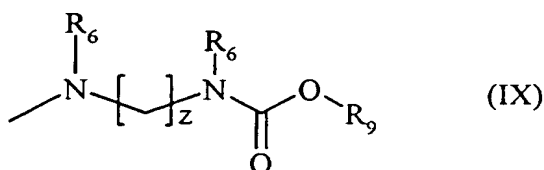
- * soit un dérivé de stéroïde,

- * soit un groupement de formule générale (VIII) :



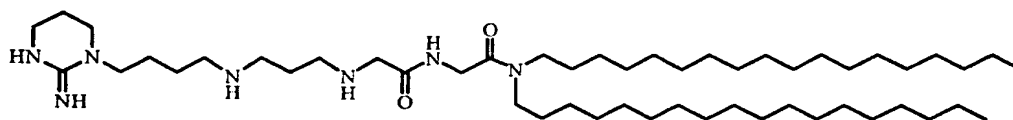
BEST AVAILABLE COPY

pour laquelle x est un entier compris entre 1 et 8 inclus, y est un entier compris entre 1 et 10 inclus, et soit Q représente un groupement $C(O)NR_6R_7$ pour lequel R_6 et R_7 sont définis comme précédemment, soit Q représente un groupement $C(O)R_8$ pour lequel R_8 représente un groupement de formule (IX) :

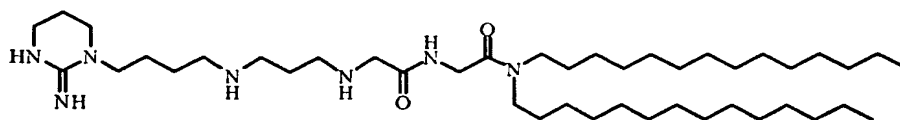


- 5 pour laquelle z est un entier compris entre 2 et 8 inclus, et R_9 est un radical aliphatique saturé ou non, éventuellement fluoré, contenant 8 à 22 atomes de carbone, ou un dérivé de stéroïde, et les deux substituants R_6 sont, indépendamment l'un de l'autre, définis comme précédemment,
- 10 ou bien R_8 représente un groupement $-O-R_9$ pour lequel R_9 est défini comme ci-dessus.
2. Composés selon la revendication 1 caractérisés en ce que le groupement R_1 est lié soit à Z soit à V d'une part et au groupement Rep d'autre part par l'intermédiaire de Y.
3. Composés selon la revendication 1 caractérisés en ce que la tête cycloamidine CA
- 15 de formule (II) comporte 5, 6, 7, ou 8 chaînons.
4. Composés selon la revendication 1 caractérisés en ce que R_3 représente un atome d'hydrogène ou un méthyle et R_4 est tel que défini dans la revendication 1, ou bien R_3 et R_4 présent dans la formule (VI) représentent des atomes d'hydrogène, ou bien R_4 est un atome d'hydrogène et R_3 est un groupement de formule (VII) dans laquelle R_5
- 20 représente un groupement CA
5. Composés selon la revendication 1 caractérisés en ce que, dans la formule (V), p et q sont choisis indépendamment l'un de l'autre parmi 2, 3 ou 4.
6. Composés selon la revendication 1 caractérisé en ce que les groupements R_6 et R_7 sont identiques ou différents et représentent chacun des chaînes aliphatiques saturées
- 25 ou non, linéaires ou ramifiées, éventuellement fluorées, contenant 10 à 22 atomes de carbone.

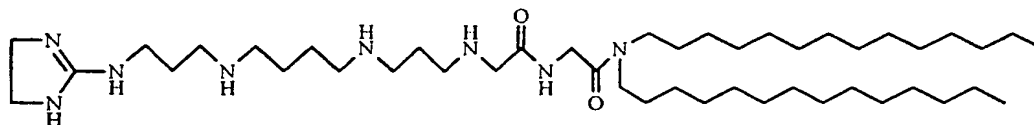
7. Composés selon la revendication 1 caractérisés en ce que les groupements R_6 et R_7 sont identiques ou différents et représentent chacun des chaînes aliphatiques saturées ou non, linéaires ou ramifiées, éventuellement fluorées, et contenant 12, 14, 16, 17, 18, ou 19 atomes de carbone.
- 5 8. Composés selon la revendications 1 caractérisés en ce que lorsque R est un dérivé de stéroïde, ledit dérivé de stéroïde est choisi parmi le cholestérol, le cholestanol, le 3- α -5-cyclo-5- α -cholestan-6- β -ol, l'acide cholique, le cholestérylforniate, le cholestanylforniate, le 3 α ,5-cyclo-5 α -cholestan-6 β -yl formiate, la cholestérylamine, la
- 10 [2,3]cyclopenta-[1,2-f]naphta-lèn-10-ylamine, ou la cholestanylamine.
9. Composés selon la revendication 1 de formules :



Composé (1)



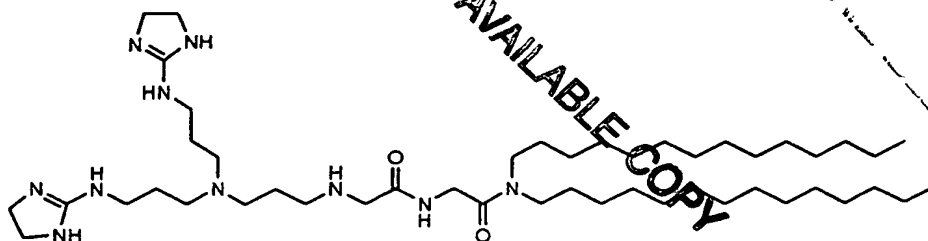
composé (2)



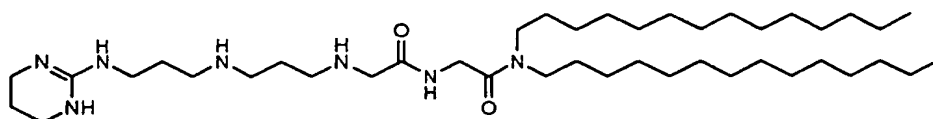
Composé (3)

59

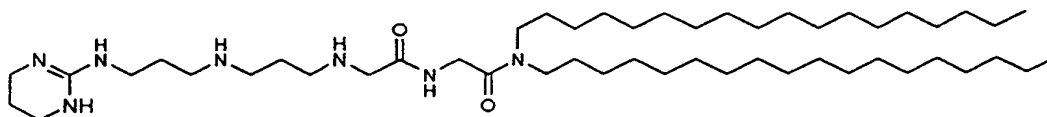
BEST AVAILABLE COPY



Composé (4)



Composé (5)



Composé (6)

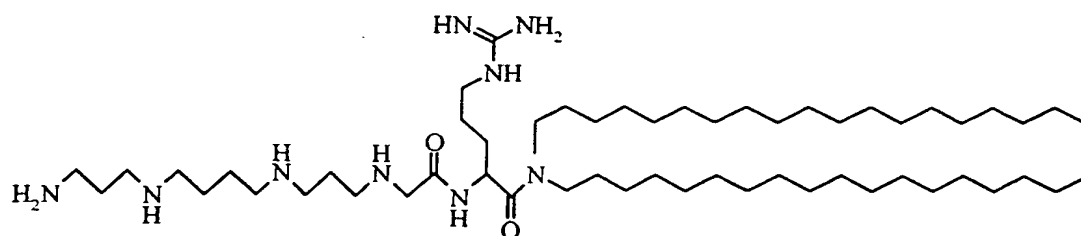
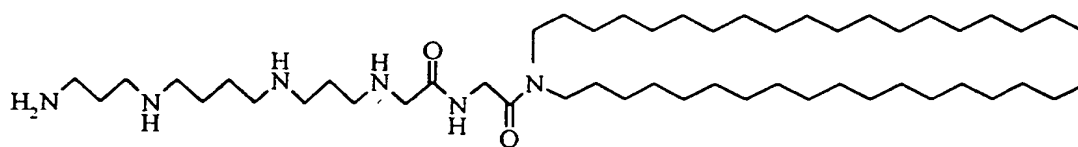
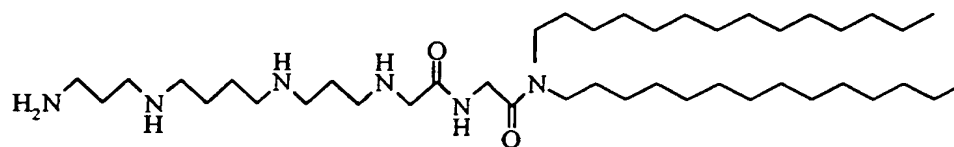
10. Procédé de préparation des composés selon les revendications 1 à 9 caractérisé en ce que l'on effectue la synthèse des briques portant la/les fonctions cycloamidine puis l'on greffe ces briques sur des lipides équipés de répartiteurs.
11. Procédé de préparation des composés selon les revendications 1 à 8 caractérisé en ce que l'on effectue la synthèse des lipopolyamines analogues puis l'on effectue la cyclisation en groupements cycloamidine.
12. Composition caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un composé de formule générale (I).
13. Composition selon la revendication 12 caractérisée en ce qu'elle comprend un composé de formule générale (I) et un acide nucléique.
14. Composition selon les revendications 12 ou 13 caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un ou plusieurs adjuvants.

15. Composition selon la revendications 14 caractérisée en ce que le ou les adjuvants sont un ou plusieurs lipides neutres à deux chaînes grasses.
16. Composition selon la revendication 15 caractérisée en ce que les lipides neutres sont des lipides naturels ou synthétiques, zwitterioniques ou dépourvus de charge ionique dans les conditions physiologique, choisis par exemple parmi la dioleoylphosphatidyléthanolamine (DOPE), l'oléoylpalmitoylphosphatidyléthanolamine (POPE), les di-stéaroyl, -palmitoyl, -mirystoyl phosphatidyléthanolamines ainsi que leurs dérivé N-méthylés 1 à 3 fois, les phosphatidylglycérols, les diacylglycérols, les glycosyldiacylglycérols, les cérébrosides (tels que notamment les galactocérébrosides), les sphingolipides (tels que notamment les sphingomyélines) ou encore les asialogangliosides (tels que notamment les asialoGM1 et GM2).
17. Composition selon la revendication 14 caractérisée en ce que l'adjuvant est un composé intervenant directement ou non au niveau de la condensation de l'acide nucléique.
18. Composition selon la revendication 17 caractérisée en ce que ledit adjuvant dérive en tout ou partie d'une protamine, d'une histone, ou d'une nucléoline et/ou de l'un de leurs dérivés, ou bien est constitué, en tout ou partie, de motifs peptidiques (KTPKKAKKP) et/ou (ATPAKKAA), le nombre des motifs pouvant varier entre 2 et 10, et pouvant être répétés de manière continue ou non.
19. Composition selon les revendications 12 à 18 caractérisée en ce qu'elle contient en outre un ou plusieurs agents de surface non-ionique(s) en quantité suffisante pour stabiliser la taille des particules de complexes nucléolipidiques.
20. Composition selon les revendications 12 à 19 caractérisée en ce qu'elle comprend un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable.
21. Composition selon les revendications 12 à 19 caractérisée en ce qu'elle comprend un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une application sur la peau et/ou les muqueuses.

BEC 61
ORIGINAL COPY

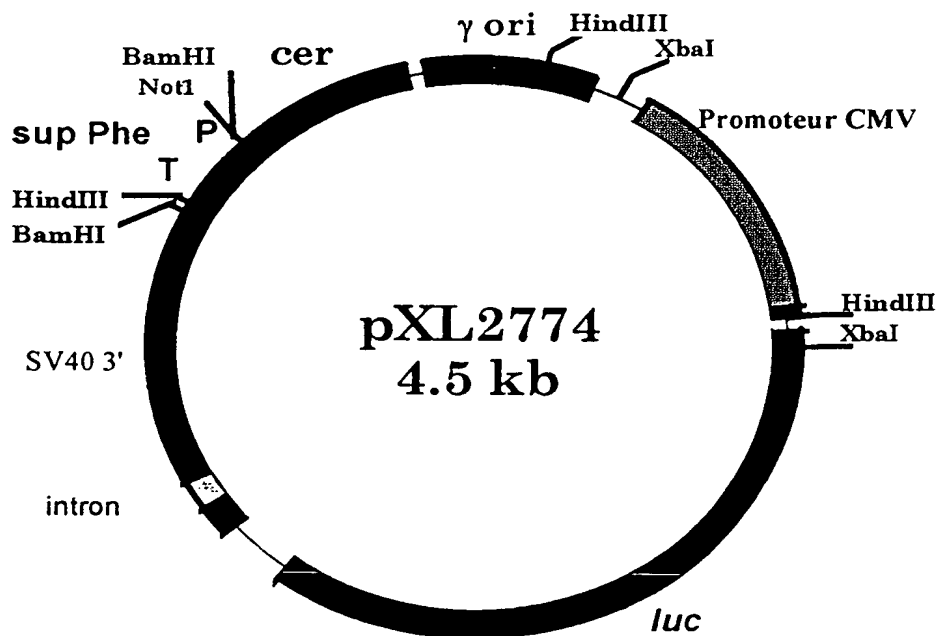
22. Composition selon la revendication 13 caractérisée en ce que ledit acide nucléique est un acide désoxyribonucléique ou un acide ribonucléique.
23. Composition selon la revendication 22 caractérisée en ce que ledit acide nucléique comprend une cassette d'expression constituée d'un ou plusieurs gènes d'intérêt thérapeutique sous contrôle d'un ou plusieurs promoteurs et d'un terminateur transcriptionnel actifs dans les cellules cibles.
24. Utilisation d'un composé selon l'une des revendications 1 à 9 pour fabriquer un médicament destiné à soigner les maladies.
25. Utilisation d'un composé selon l'une des revendications 1 à 9 pour fabriquer un médicament destiné à soigner les maladies par transfert d'acides nucléiques dans les cellules par voie intramusculaire.
26. Méthode de transfert d'acides nucléiques dans les cellules comprenant les étapes suivantes :
- (1) la mise en contact de l'acide nucléique avec un composé de formule générale (I) tel que défini ci-avant, pour former un complexe nucléolipidique, et
- (2) la mise en contact des cellules avec le complexe nucléolipidique formé en (1).
27. Méthode de transfert d'acides nucléiques dans les cellules selon la revendication 26 caractérisée en ce que ledit acide nucléique et/ou ledit composé sont préalablement mélangés à un ou plusieurs adjuvants.
28. Méthode de traitement de maladies par administration d'un acide nucléique codant pour une protéine ou pouvant être transcrit en un acide nucléique apte à corriger lesdites maladies, ledit acide nucléique étant associé à un composé de formule générale (I).

BEST AVAILABLE COPY

FIG. 1/10**lipide A****lipide B****lipide C**

2/10
BEST AVAILABLE COPY

FIG. 2/10



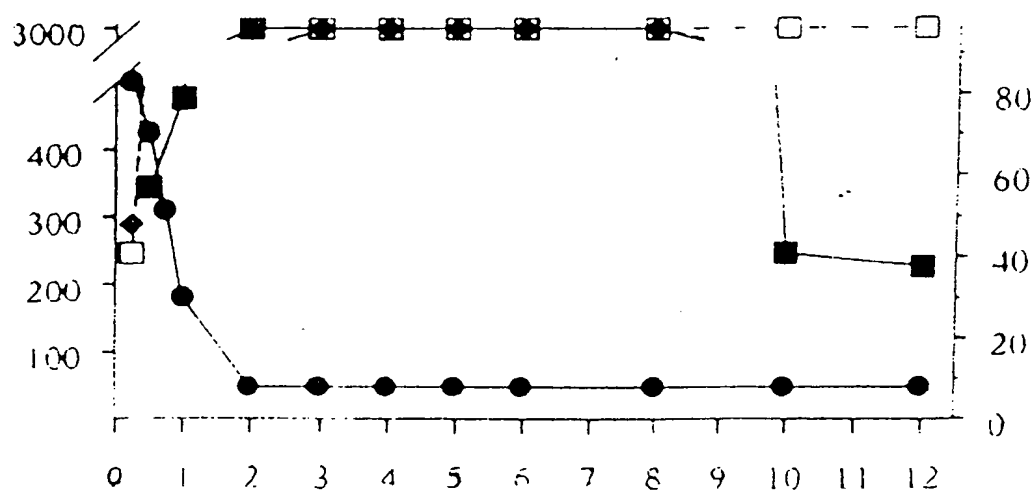


3/10

FIG. 3/10

Composé 1

BEST AVAILABLE COPY

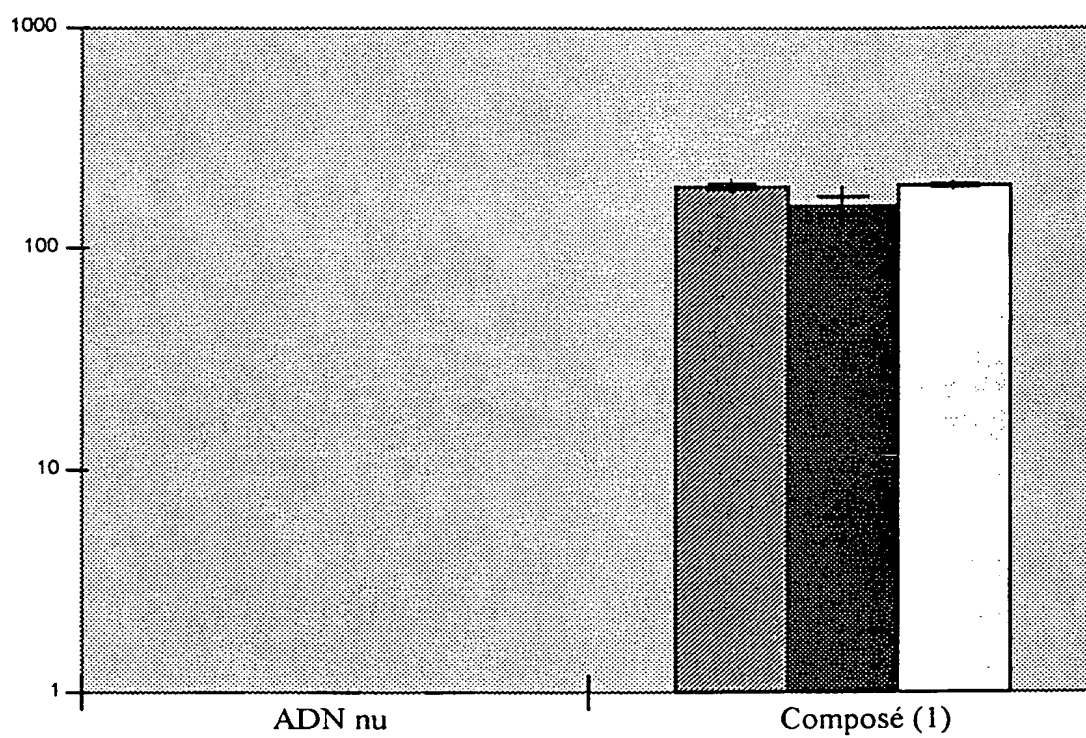


4/10

FIG. 4/10

BEST AVAILABLE COPY

Luciferase (pg/puit)

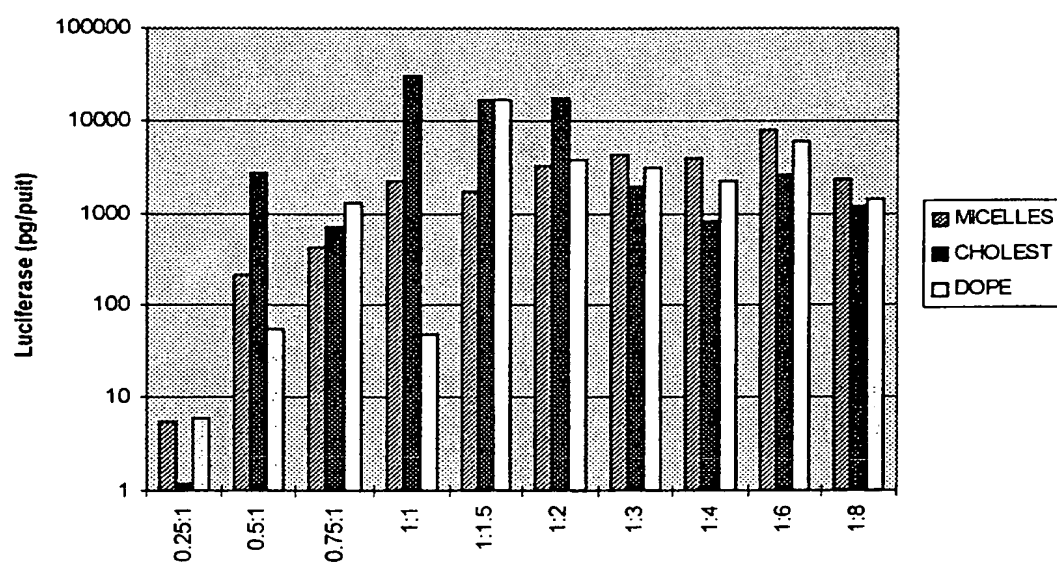


5/10

FIG. 5/10

BEST AVAILABLE COPY

Composé (3), in vitro (Cellules HeLa)

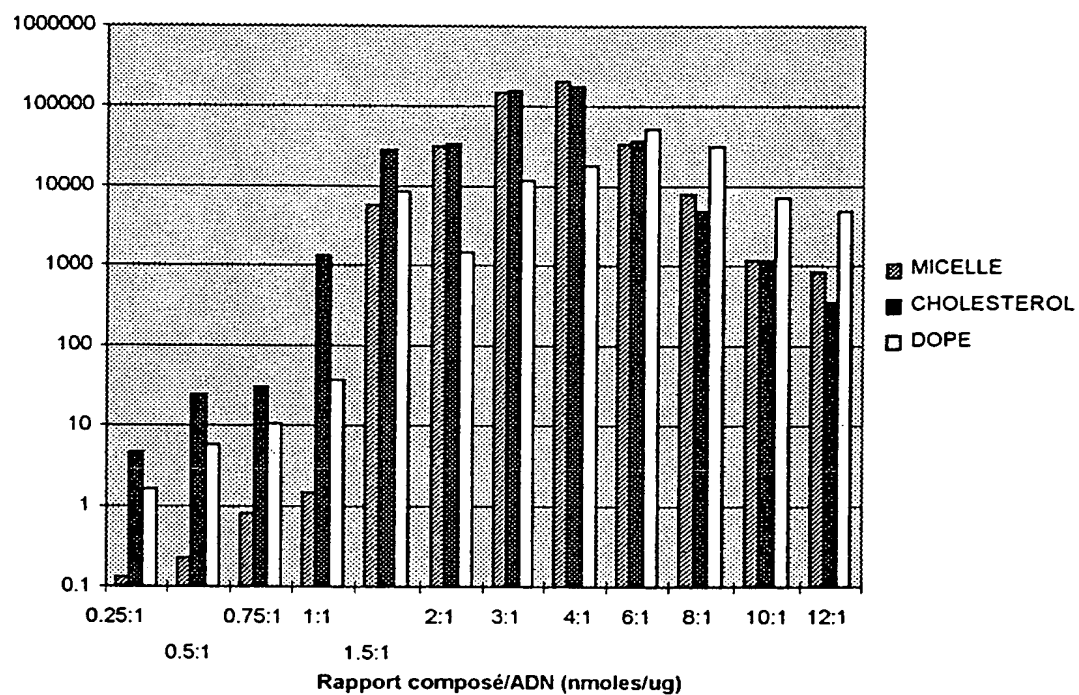


6/10

FIG. 6/10

BEST AVAILABLE COPY

Composé (5), in vitro (Cellules HeLa)

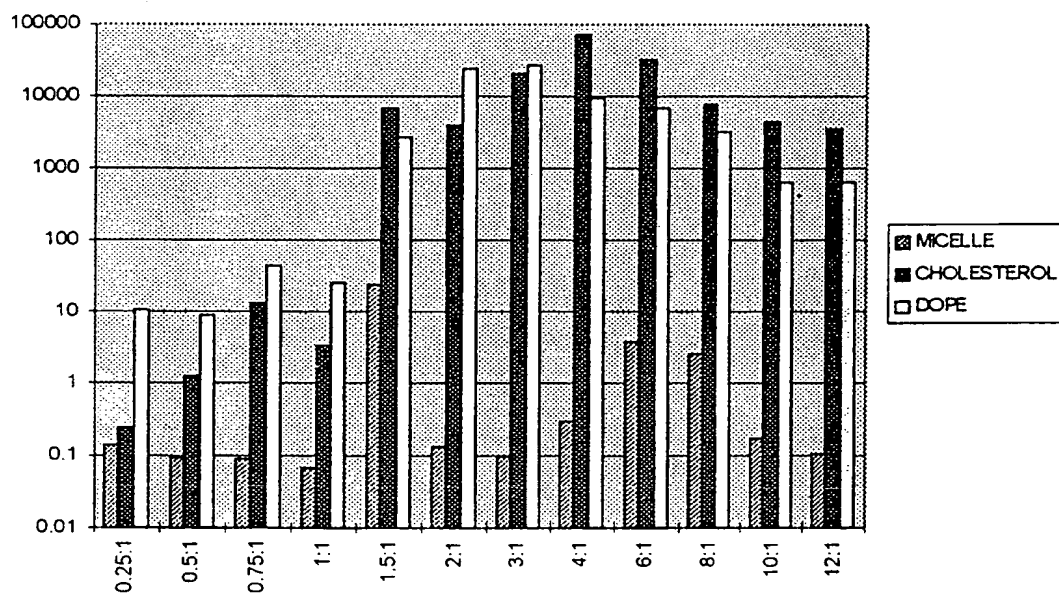


7/10

FIG. 7/10

BEST AVAILABLE COPY

Composé (6), in vitro (cellules heLa)

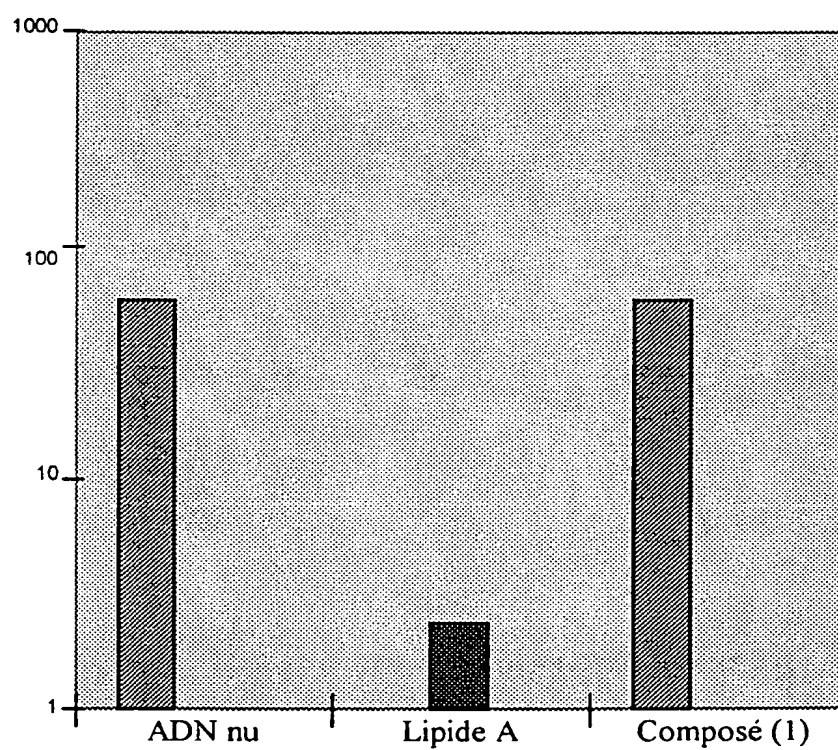




8/10

FIG. 8/10

BEST AVAILABLE COPY

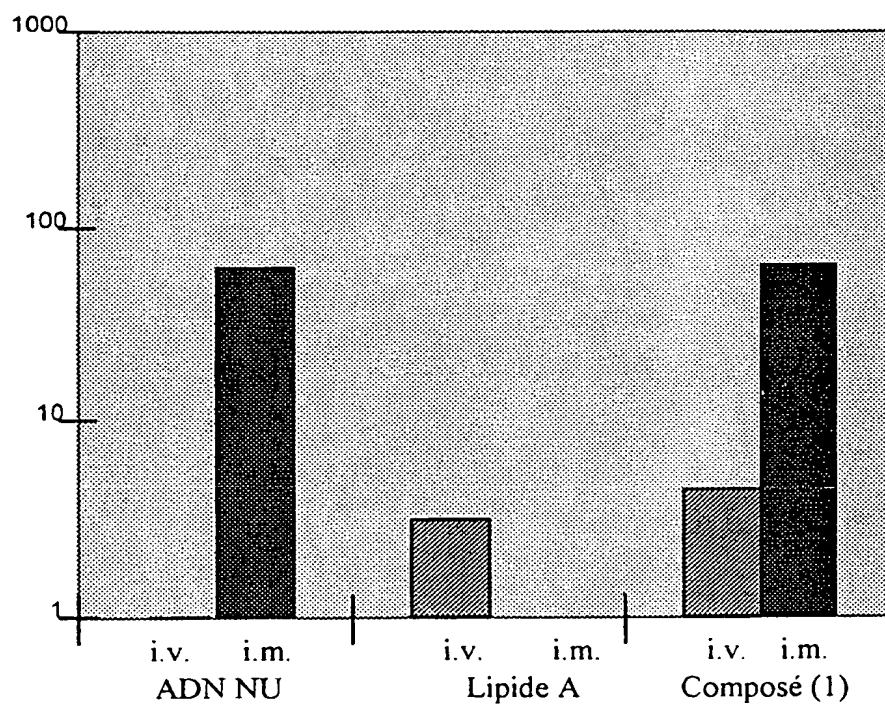




9/10

FIG. 9/10

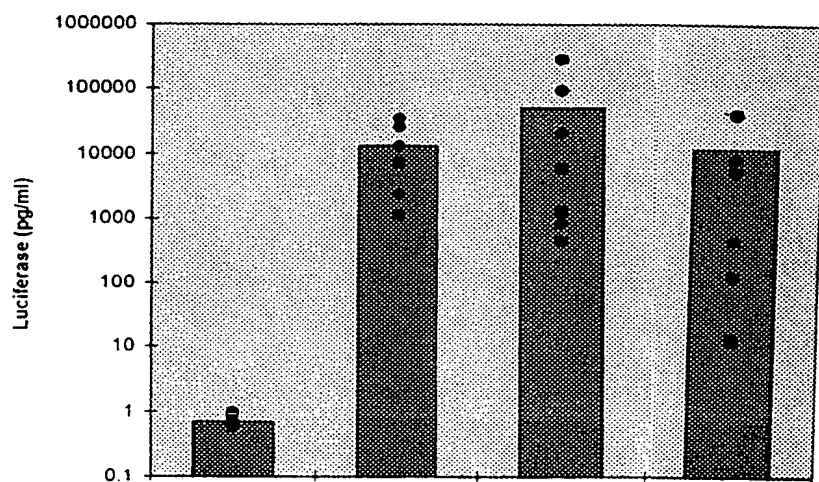
BEST AVAILABLE COPY



10/10

FIG. 10/10

BEST AVAILABLE COPY



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/00740

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07D233/48 C07D239/14 C12N15/87 A61K31/47 C07J41/00
C07K5/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07D C12N A61K C07K C07J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 97 18185 A (RHONE-POULENC RORER S.A.) 22 May 1997 cited in the application see claims ---	1-28
Y	WO 97 31935 A (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 4 September 1997 see claims ---	1-28
A	WO 96 17823 A (RHONE POULENC RORER SA) 13 June 1996 see claims ---	1-28
A	WO 95 18863 A (RHONE POULENC RORER SA) 13 July 1995 see claims ---	1-28
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 May 1999

Date of mailing of the international search report

31/05/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Henry, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No

PCT/FR 99/00740

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 394 111 A (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 24 October 1990 cited in the application see the whole document ---	1-28
A	WO 93 05162 A (THE UNIVERSITY OF TENNESSEE RESEARCH CORPORATION) 18 March 1993 see claims -----	1-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP 99/00740

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 28
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Observation: Although Claim 28 concerns a method for the treatment of the human/animal body, the search was carried out on the basis of the effects attributed to the product/composition.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

National Application No

PCT/FR 99/00740

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9718185 A	22-05-1997	FR 2741066 A	16-05-1997
		AU 7576896 A	05-06-1997
		CA 2235721 A	22-05-1997
		CZ 9801473 A	12-08-1998
		EP 0861228 A	02-09-1998
		NO 981944 A	29-04-1998
WO 9731935 A	04-09-1997	FR 2745569 A	05-09-1997
		FR 2751972 A	06-02-1998
		AU 1930497 A	16-09-1997
		CZ 9802772 A	16-12-1998
		EP 0888379 A	07-01-1999
		NO 983691 A	12-08-1998
WO 9617823 A	13-06-1996	FR 2727679 A	07-06-1996
		AU 4307296 A	26-06-1996
		BR 9510080 A	30-12-1997
		CA 2208184 A	13-06-1996
		CZ 9701711 A	18-03-1998
		EP 0796240 A	24-09-1997
		FI 972366 A	04-06-1997
		HU 77171 A	02-03-1998
		JP 10509958 T	29-09-1998
		NO 972566 A	05-06-1997
		SK 70197 A	05-11-1997
		ZA 9510326 A	11-06-1996
WO 9518863 A	13-07-1995	FR 2714830 A	13-07-1995
		AU 1458395 A	01-08-1995
		CA 2180872 A	13-07-1995
		EP 0738328 A	23-10-1996
		FI 962799 A	09-07-1996
		JP 9508100 T	19-08-1997
		NO 962791 A	02-07-1996
		US 5846947 A	08-12-1998
		ZA 9500137 A	09-09-1995
EP 0394111 A	24-10-1990	FR 2645866 A	19-10-1990
		AT 154035 T	15-06-1997
		CA 2014518 A	17-10-1990
		DE 69030839 D	10-07-1997
		DE 69030839 T	20-11-1997
		DK 394111 T	08-09-1997
		ES 2104593 T	16-10-1997
		FR 2646161 A	26-10-1990
		GR 3023691 T	30-09-1997
		IL 94077 A	29-12-1994
		JP 2292246 A	03-12-1990
		JP 2716565 B	18-02-1998
		US 5476962 A	19-12-1995
		US 5616745 A	01-04-1997
		US 5171678 A	15-12-1992
WO 9305162 A	18-03-1993	US 5283185 A	01-02-1994
		AU 665029 B	14-12-1995
		AU 2656592 A	05-04-1993
		CA 2116676 A	18-03-1993
		EP 0663013 A	19-07-1995

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/00740

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9305162 A		JP 7500963 T SG 50630 A	02-02-1995 20-07-1998
<div>BEST AVAILABLE COPY</div>			



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

internationale No
PCT/FR 99/00740

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C07D233/48 C07D239/14 C12N15/87 A61K31/47 C07J41/00
C07K5/06

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07D C12N A61K C07K C07J

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO 97 18185 A (RHONE-POULENC RORER S.A.) 22 mai 1997 cité dans la demande voir revendications ---	1-28
Y	WO 97 31935 A (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 4 septembre 1997 voir revendications ---	1-28
A	WO 96 17823 A (RHONE POULENC RORER SA) 13 juin 1996 voir revendications ---	1-28
A	WO 95 18863 A (RHONE POULENC RORER SA) 13 juillet 1995 voir revendications ---	1-28
	--- -/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

20 mai 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

31/05/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Henry, J

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Requête Internationale No

PCT/FR 99/00740

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 0 394 111 A (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 24 octobre 1990 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-28
A	WO 93 05162 A (THE UNIVERSITY OF TENNESSEE RESEARCH CORPORATION) 18 mars 1993 voir revendications -----	1-28

BEST AVAILABLE COPY

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR 99/00740

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☒ Les revendications n°s 28 se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
Remarque: Bien que la revendication 28 concerne une méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit/à la composition.
2. ☐ Les revendications n°s se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n°s sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°s
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°s

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Recherche Internationale No

PCT/FR 99/00740

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9718185 A	22-05-1997	FR 2741066 A	16-05-1997
		AU 7576896 A	05-06-1997
		CA 2235721 A	22-05-1997
		CZ 9801473 A	12-08-1998
		EP 0861228 A	02-09-1998
		NO 981944 A	29-04-1998
WO 9731935 A	04-09-1997	FR 2745569 A	05-09-1997
		FR 2751972 A	06-02-1998
		AU 1930497 A	16-09-1997
		CZ 9802772 A	16-12-1998
		EP 0888379 A	07-01-1999
		NO 983691 A	12-08-1998
WO 9617823 A	13-06-1996	FR 2727679 A	07-06-1996
		AU 4307296 A	26-06-1996
		BR 9510080 A	30-12-1997
		CA 2208184 A	13-06-1996
		CZ 9701711 A	18-03-1998
		EP 0796240 A	24-09-1997
		FI 972366 A	04-06-1997
		HU 77171 A	02-03-1998
		JP 10509958 T	29-09-1998
		NO 972566 A	05-06-1997
		SK 70197 A	05-11-1997
		ZA 9510326 A	11-06-1996
WO 9518863 A	13-07-1995	FR 2714830 A	13-07-1995
		AU 1458395 A	01-08-1995
		CA 2180872 A	13-07-1995
		EP 0738328 A	23-10-1996
		FI 962799 A	09-07-1996
		JP 9508100 T	19-08-1997
		NO 962791 A	02-07-1996
		US 5846947 A	08-12-1998
		ZA 9500137 A	09-09-1995
EP 0394111 A	24-10-1990	FR 2645866 A	19-10-1990
		AT 154035 T	15-06-1997
		CA 2014518 A	17-10-1990
		DE 69030839 D	10-07-1997
		DE 69030839 T	20-11-1997
		DK 394111 T	08-09-1997
		ES 2104593 T	16-10-1997
		FR 2646161 A	26-10-1990
		GR 3023691 T	30-09-1997
		IL 94077 A	29-12-1994
		JP 2292246 A	03-12-1990
		JP 2716565 B	18-02-1998
		US 5476962 A	19-12-1995
		US 5616745 A	01-04-1997
		US 5171678 A	15-12-1992
WO 9305162 A	18-03-1993	US 5283185 A	01-02-1994
		AU 665029 B	14-12-1995
		AU 2656592 A	05-04-1993
		CA 2116676 A	18-03-1993
		EP 0663013 A	19-07-1995

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

...e Internationale No

PCT/FR 99/00740

50098 T	02-02-1
50630	20-07-1

AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)